

DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA, AMBIENTAL Y DE PROCESOS



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

E.T.S.E. Departament d'Enginyeria Química

**DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE MICROALGAS PROCEDENTES
DEL TRATAMIENTO DEL EFLUENTE DE UN REACTOR
ANAEROBIO DE MEMBRANAS SUMERGIDAS**

TESIS DOCTORAL

SILVIA GRESES HUERTA ©

Diciembre, 2017

Directores:

Dra. Aurora Seco Torrecillas

Dr. Daniel Aguado García

DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA, AMBIENTAL Y DE PROCESOS



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

E.T.S.E. Departament d'Enginyeria Química

**DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE MICROALGAS PROCEDENTES
DEL TRATAMIENTO DEL EFLUENTE DE UN REACTOR
ANAEROBIO DE MEMBRANAS SUMERGIDAS**

Memoria que, para optar al grado de doctor por la Universitat de València,
presenta **SILVIA GRESES HUERTA** ©.

Diciembre, 2017

Impreso en España / Printed in Spain

© Silvia Greses Huerta, 2017

© Autoeditado, 2017

Correo electrónico: silvia.greses@gmail.com

Nº tesis: 9753

Depósito legal: UV-DOCTES16-738057

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción total o parcial de esta tesis doctoral, ni su incorporación a un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma, idioma o por cualquier medio, sea este electrónico, mecánico, por fotocopia, por grabación u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de la autora.

All rights reserved by the autor. No part of this thesis may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form, any language or by any means – electronic, mechanical, photocopying or otherwise – without permission in writing from the autor.

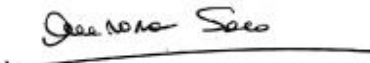
Dña. **Aurora Seco Torrecillas**, Catedrática del Dpto. de Ingeniería Química de la Universitat de València, y

D. **Daniel Aguado García**, Titular del Instituto de Ingeniería del Agua y Medioambiente de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "**Degradación anaerobia de microalgas procedentes del tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas sumergidas**", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **Silvia Greses Huerta**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 18 de Diciembre de 2017.



Fdo. Aurora Seco Torrecillas



Fdo. Daniel Aguado García

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar estas líneas para expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar a mis directores de Tesis, la doctora Aurora Seco Torrecillas y el doctor Daniel Aguado García, por su dedicación y esfuerzo, por haber sabido transmitirme sus conocimientos y experiencia profesional, por la confianza depositada en mí y por animarme a seguir adelante durante todo este tiempo.

Al doctor José Ferrer Polo, por su constante colaboración, por sus numerosas sugerencias ante los problemas encontrados durante la realización del trabajo experimental y, junto a la doctora Aurora Seco Torrecillas, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Ministerio de Economía y Competitividad, por la financiación percibida durante estos cuatro años de tesis mediante una beca de Formación de Personal Investigador (BES-2012-055972).

A la Universidad de Valencia, especialmente al departamento de Ingeniería Química, por su acogida durante todos estos años y por darme la oportunidad de descubrir la experiencia de la docencia.

A la Norwegian University of Life Sciences (NMBU, Noruega), en especial al doctor Svein Jarle Horn, responsable del grupo de investigación Bioprocess Technology and Biorefining (BTB), por hacerme sentir como una más del grupo desde el primer día, por su amabilidad y cariño, y por enseñarme a ver la ciencia desde otro punto de vista. Tusen takk.

A Daniel, por su inestimable ayuda y disponibilidad permanente, por su paciencia infinita y su apoyo constante, por animarme en todo momento y celebrar conmigo cada logro de esta tesis. Gracias por aportar tanto en estos años, a nivel laboral y personal.

A Luis, Alberto, Nuria, Josep, Vicky, Ramón y Joaquín, por estar siempre dispuestos a ayudarme en todas las dudas que han ido surgiendo, con la profesionalidad que les caracteriza.

A Maria, gracias por apoyarme en este último e importante tramo de la tesis, por ofrecerme la tranquilidad necesaria para escribir en tu despacho y grandes dosis de chocolate. Gracias por ayudarme con miles de dudas, por animarme en momentos críticos y por saber sacarme una sonrisa, eres una gran profesional y una maravillosa persona. A Reme, por su ayuda y por los momentos compartidos estos últimos meses, muchas gracias.

A Ángel, Juan, Freddy y Laura, por enseñarme a operar la planta piloto y transmitirme sus conocimientos. A Javier Eduardo, por instruirme en este largo camino de tesis y por sus consejos, gracias.

A Antonio y José Vicente, por su ayuda en las distintas gestiones y “papeleos”, junto con los quebraderos de cabeza que conllevan,

A Patri, Ruth, Tao, Alex Josué y Mónica, por las innumerables horas que hemos pasado en planta y fuera de ella, por todos los momentos vividos y el compañerismo que nos ha unido. En especial a Patri, por toda la ayuda que me ha brindado estos años, tantas horas compartidas han culminado en una sincera amistad, muchas gracias.

A Rafa y Berta, por nuestras conversaciones en el café y tantas risas juntos, que hacen más llevadero el trabajo. A Dani, Juan, Stephanie, Óscar, Pau, Guille y Eladio, por estar siempre dispuestos a ayudar, y por todos los buenos momentos y cervecitas que hemos compartido.

A Rebecca y a Núria, por toda vuestra ayuda y apoyo incondicional, por nuestras largas conversaciones sobre la vida y, cómo no, sobre la tesis, que han dado lugar a momentos inolvidables y muchas risas. Gracias por todos esos detalles que nos han convertido en compañeras y grandes amigas.

A mis amigas, Majo, Marisa, Bego, Sara y Maylin, por nuestras numerosas tardes de café y risas, tan necesarias para relajar la mente y recobrar la cordura, me alegro de que forméis parte de mi vida. A Amparo y Lydia, mis amigas de la infancia. Gracias por estar siempre a mi lado, porque aunque pasemos largas temporadas sin vernos, nuestra amistad permanece intacta. A Paco y Jesús, mis grandes amigos de la carrera, por nuestras cervecitas, por las risas eternas y los momentos de ‘rajoterapia’ que ayudan a liberar la mente y el alma. Muchas gracias.

Al pilar fundamental de mi vida, mi familia. Gracias por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones y por creer en mí. Gracias por alegraros de cada éxito y por secar mis lágrimas en los momentos más duros, por vuestra infinita paciencia. En especial a mis padres, que son los que más han tenido que soportar mis malos ratos y manías, que no son pocas. Gracias por preocuparos por mi bienestar en cada momento y proporcionarme una vida de plena felicidad. Gracias por todo.

—

Resumen

Resumen

La escasez de recursos naturales y el agotamiento de los combustibles fósiles han impulsado un creciente interés en el uso de microalgas, dado que han sido reconocidas como una de las alternativas más sostenibles para suplir la demanda energética global a largo plazo y detener los acusados problemas asociados al cambio climático. Actualmente, la combinación de un tratamiento anaerobio de agua residual y su post-tratamiento mediante un cultivo de microalgas supone una prometedora alternativa, pues permite la obtención simultánea de energía en forma de biogás y un recurso hídrico reutilizable, mientras que los nutrientes son empleados para la producción de una biomasa algal, susceptible de valorización energética mediante digestión anaerobia.

El objetivo de esta tesis doctoral ha consistido en estudiar la degradación anaerobia de la biomasa algal, producida en el efluente de un tratamiento anaerobio de agua residual urbana, con el fin de maximizar su valorización energética en forma de biogás. Para ello, se llevaron a cabo dos estrategias basadas en incrementar la biodegradabilidad de las microalgas: (i) mediante un pretratamiento enzimático y (ii) potenciando la actividad hidrolítica de los microorganismos anaerobios.

Los resultados obtenidos del pretratamiento enzimático de las microalgas revelaron que su biodegradabilidad anaerobia puede ser incrementada mediante la adecuada combinación de pH, temperatura y dosis de enzima, teniendo una elevada influencia la adaptación del inóculo y el tipo de microalgas que se pretende degradar. Así pues, mediante el pretratamiento enzimático se consiguió incrementar la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. del 36.7% al 65.7%.

Alternativamente a los pretratamientos, la biodegradabilidad de las microalgas puede ser incrementada potenciando la actividad hidrolítica de la propia biomasa anaerobia de dos formas: operando un reactor mesófilo a elevados tiempos de retención celular

(TRC) y llevando a cabo la degradación anaerobia de microalgas en condiciones termófilas (55°C).

La operación de un biorreactor anaerobio de membrana (AnMBR) a elevados TRC y bajo condiciones mesófilas (35°C), favorece el desarrollo de microorganismos con baja tasa de crecimiento e involucrados en la degradación de los componentes que constituyen a las microalgas. De esta forma, se alcanzó una biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. del 70.9%, con la operación del AnMBR a un TRC de 100 días, y una biodegradabilidad del 73.9% de las microalgas *Chlorella* spp. con un TRC de 140 días. A su vez, el uso de la tecnología de membranas permitió modificar simultáneamente el caudal de tratamiento y la concentración de microalgas en el influente, lo que reduce la concentración de posibles inhibidores así como los costes energéticos asociados al proceso de concentración de microalgas. Además, la elevada biodegradabilidad dio lugar a bajas producciones de fango, lo que reduce los costes de su tratamiento y disposición, y generó un efluente rico en nutrientes que puede ser reutilizado para el cultivo de nueva biomasa algal.

Los microorganismos termófilos exhiben una alta actividad hidrolítica que permitió obtener un incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal del 20.4% respecto a su digestión anaerobia a 35°C, bajo las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, se observó que el CSTR termófilo (*Continuous Stirred Tank Reactor*) no puede trabajar con concentraciones de microalgas que alcancen un valor de DQO de 20000 mgO₂·L⁻¹, debido a la liberación de grandes cantidades de amonio al medio que provoca la inhibición del proceso biológico por amoníaco. Así pues, se determinó que la presencia de amoníaco en concentraciones cercanas a 70 mgN-NH₃·L⁻¹ provoca el inicio de la inhibición, alcanzando el 30% de inhibición cuando la concentración se incrementa hasta 82 mgN-NH₃·L⁻¹.

El análisis genómico del AnMBR mesófilo confirmó que su operación a un elevado TRC (100 días) favoreció la biodiversidad microbiana y promovió el desarrollo de una biomasa anaerobia fuertemente hidrolítica, responsable de la elevada biodegradabilidad de las microalgas alcanzada (70.9%). Así mismo, el análisis microbiológico del CSTR termófilo reveló la presencia de microorganismos con una elevada capacidad proteolítica y celulolítica, así como la detección del phylum EM3. A pesar de que la función metabólica de EM3 en digestores anaerobios no está todavía definida, la elevada abundancia relativa de este phylum en el reactor (38.7%) indica que debe estar involucrado en la degradación anaerobia de los compuestos de la biomasa algal en condiciones termófilas.

La presente tesis doctoral demuestra que la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de microalgas puede maximizarse sin la necesidad de aplicar costosos pretratamientos, dando lugar a una de las mayores biodegradabilidades de biomasa algal reportada hasta el momento.

Resum

L'escassetat de recursos naturals i l'esgotament dels combustibles fòssils han impulsat un creixent interès en l'ús de microalgues, ja que han sigut reconegudes com a una alternativa sostenible per suplir la demanda energètica global i mitigar els efectes del canvi climàtic. Actualment, la combinació d'un tractament anaerobi d'aigua residual urbana i el post-tractament mitjançant un cultiu de microalgues suposa una prometedora alternativa, doncs permet obtenir simultàniament energia en forma de biogàs i un recurs hídric reutilitzable, mentre els nutrients s'utilitzen per la producció d'una biomassa algal susceptible de valorització energètica per mitjà d'una digestió anaeròbia.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha consistit en l'estudi de la degradació anaeròbia de biomassa algal, produïda en l'efluent d'un tractament anaeròbia d'aigua residual urbana, a fi de maximitzar-ne la valorització energètica en forma de biogàs. Per a tal fi, es portaren a terme dues estratègies basades a incrementar la biodegradabilitat de les microalgues: (i) mitjançant un pretractament enzimàtic i (ii) potenciant l'activitat hidrolítica dels microorganismes anaerobis.

Els resultats obtinguts del pretractament enzimàtic de les microalgues revelaren que la seua biodegradabilitat pot ser incrementada mitjançant la combinació adequada de pH, temperatura i dosi d'enzims, tenint una elevada influència l'adaptació de l'inòcul i el tipus de microalga que es pretén degradar. En conseqüència, per mitjà del pretractament enzimàtic s'incrementà la biodegradabilitat de les microalgues *Scenedesmus* spp. del 36.7% fins al 65.7%.

Alternativament als pretractaments, la biodegradabilitat de les microalgues pot ser incrementada potenciant la activitat hidrolítica de la pròpia biomassa anaeròbia de

dues formes: operant el reactor a elevats temps de retenció cel·lular (TRC) i duent a terme la degradació anaeròbia de microalgues en condicions termòfiles (55°C).

L'operació d'un biorreactor anaerobi de membrana (AnMBR) a TRC elevats i en condicions mesòfiles, afavoreix el desenvolupament de microorganismes amb baixa taxa de creixement i involucrats en la degradació anaeròbia de les microalgues. D'aquesta forma, es va assolir una biodegradabilitat de les microalgues *Scenedesmus* spp. del 70.9%, amb l'operació del AnMBR a 100 dies de TRC, i una biodegradabilitat del 73.9% de les microalgues *Chlorella* spp. amb un TRC de 140 dies. A l'hora, l'ús de la tecnologia de membranes va permetre modificar simultàniament el cabal de tractament i la concentració de microalgues en l'influent, la qual cosa redueix la concentració de possibles inhibidors així com els costos energètics associats al procés de concentració de les microalgues. A més, l'elevada biodegradabilitat va donar lloc a baixes produccions de fang, la qual cosa redueix els costos del tractament i disposició d'aquest, i va generar un efluent ric en nutrients que es pot reutilitzar per al cultiu de nova biomassa algal.

Els microorganismes termòfils exhibeixen una alta activitat hidrolítica que va permetre obtenir un increment de la biodegradabilitat de la biomassa algal del 20.4% respecte a la digestió anaeròbia a 35°C, sota les mateixes condicions operacionals. No obstant, es va observar que el CSTR termòfil (*Continuous Stirred Tank Reactor*) no pot treballar amb concentracions de microalgues que assolisquen un valor de DQO de 20000 mgO₂·L⁻¹ com a conseqüència del lliurament de grans quantitats d'amoni al medi que provoca la inhibició del procés biològic per amoníac. Així doncs, es va determinar que la presència d'amoníac en concentracions properes a 70 mgN-NH₃·L⁻¹ causa l'inici de la inhibició, i s'arriba al 30% d'inhibició quan la concentració s'incrementa fins a 82 mgN-NH₃·L⁻¹.

L'anàlisi genòmic del AnMBR mesòfil confirmà que l'operació d'aquest a un elevat TRC (100 dies) va afavorir la biodiversitat microbiana i va promoure el

desenvolupament d'una biomassa fortament hidrolítica, responsable de l'elevada biodegradabilitat de les microalgues que es va assolir (70.9%). Al mateix temps, l'anàlisi microbiològic del CSTR termòfil revelà la presència de microorganismes amb una elevada capacitat proteolítica i cel·lulolítica, així com la detecció del phylum EM3. Encara que la funció metabòlica d'EM3 en digestors anaerobis no està definida, l'elevada abundància relativa d'aquest phylum al reactor (38.7%) indica que deu estar involucrat en la degradació anaeròbia dels compostos de la biomassa algal, en condicions termòfiles.

La present tesi doctoral demostra que la producció de biogàs a partir de microalgues es pot maximitzar, sense que calga aplicar costosos pretractaments, i donar lloc a una de les majors biodegradabilitats de biomassa algal reportades fins ara.

Abstract

Depletion of natural resources and fossil fuel reserves have triggered intense attention in the use of microalgae, which have been recognised as sustainable alternative for meeting the global energy demand in the long-term and to mitigate the effects of climate change. Nowadays, the combination of anaerobic wastewater treatment and its post-treatment through microalgae-based technologies can be considered an interesting approach for recovering energy from sewage and water resource. Likewise, mineral nutrients are used to produce microalgal biomass that can be energetically valorised through anaerobic digestion.

The main objective of this thesis has been to study the anaerobic degradation of microalgae, which comes from the effluent of a wastewater anaerobic treatment, in order to maximize their energetic valorisation as biogas. For this purpose, two strategies were performed to increase microalgal biodegradability: (i) an enzymatic pretreatment of microalgal biomass and (ii) improving the hydrolytic activity of anaerobic microorganisms.

Results retrieved from the enzymatic pretreatment revealed that microalgal biodegradation can be increased through an appropriate combination of pH, temperature and enzyme dose, wherein inoculum adaptation and the type of microalgae used as a substrate have a significant influence on the result. Concretely, enzymatic pretreatment increased *Scenedesmus* spp. microalgal biodegradability from 36.7 to 65.7%.

Alternatively, microalgal biodegradability can be increased by improving the hydrolytic activity of anaerobic biomass in two ways: running the mesophilic anaerobic reactor at high solid retention times (SRT) and operating an anaerobic reactor at thermophilic conditions (55°C).

A mesophilic anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) operated at high SRT promote the retention of low growth rate microorganisms involved in microalgal degradation. At 100 days of SRT, *Scenedesmus* spp. microalgae achieved a biodegradability of 70.9% and at 140 days of SRT *Chlorella* spp. microalgae achieved a 73.9% of biodegradability. Likewise, the use of membrane technology allows to simultaneously increase the treatment flow rate and decrease microalgal concentration in the influent, which reduces the concentration of possible inhibitors and the energy costs associated with microalgal harvesting. Furthermore, high microalgal biodegradability resulted in low sludge productions, thereby leading to a cost reduction of treatment and disposal of sludge, and produced a nutrient-rich effluent that can be reused as a grown medium for new microalgae culture.

Thermophilic microorganisms exhibit high hydrolytic activity that increases microalgal biodegradation in 20.4% in comparison with the mesophilic process under the same operational conditions. However, it has been observed that thermophilic CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) cannot be run with a microalgal COD concentration exceeding $20000 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ due to a high amount of ammonium released, which causes the biological process inhibition by free ammonia. It was observed that process inhibition started at $70 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ and achieved a 30% of inhibition when free ammonia concentration increased up to $82 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.

Genomic analyse of mesophilic AnMBR confirmed that high SRT (100 days) promoted high microbial biodiversity, enriched in an anaerobic microorganisms with high hydrolytic activity that are likely responsible for the noticeably microalgal biodegradation (70.9%). Likewise, microbial analyse of thermophilic CSTR revealed a microbial population with high cellulolytic and proteolytic capabilities as well as the detection of EM3 phylum. Although functional role of EM3 remains undefined in anaerobic digesters, the high relative abundance of this phylum (38.7%)

indicates that is likely involved in microalgal anaerobic degradation under thermophilic conditions.

This thesis has demonstrated that biogas production through anaerobic digestion of microalgal biomass can be maximized without applying costly pretreatments, thereby resulting in one of the highest biogas production currently reported from the anaerobic digestion of raw microalgae grown in wastewater.

—

Índice

Índice

1. Introducción.....	3
1.1. Aguas residuales	4
1.1.1. Contaminación de las aguas	4
1.1.2. El agua residual como fuente de recursos	5
1.2. Tratamientos biológicos convencionales de aguas residuales.....	7
1.2.1. Tratamiento de las aguas residuales mediante fangos activados	8
1.2.2. Estabilización de los fangos	10
1.3. Tratamientos anaerobios de aguas residuales.....	11
1.3.1. Procesos implicados en la degradación anaerobia de la materia orgánica	14
1.3.2. Parámetros que afectan al proceso anaerobio.....	27
1.3.3. Tecnologías para el tratamiento anaerobio.....	38
1.4. Post-tratamiento de efluentes de procesos anaerobios	46
1.4.1. Post-tratamientos convencionales	47
1.4.2. Microalgas para el tratamiento de aguas residuales	48
1.5. Digestión anaerobia de microalgas	57
1.5.1. Especies de microalgas.....	58
1.5.2. Estrategias para incrementar la producción de biogás a partir de microalgas	64
2. Objetivos.....	81
3. Materiales y métodos.....	87
3.1. Biomasa microalgal.....	87
3.2. Biodegradabilidad anaerobia de la microalgas. Pretratamiento enzimático.....	91
3.3. Descripción de los reactores y las condiciones operacionales	97
3.3.1. Reactor mesófilo	98
3.3.2. Reactor termófilo.....	103
3.4. Seguimiento de la estabilidad y eficiencia del proceso biológico.....	108
3.4.1. Balance de DQO.....	109
3.4.2. Balance de sólidos volátiles	113
3.4.3. Eficiencia del proceso	113

3.4.4. Amoníaco	114
3.5. Procedimientos analíticos	115
3.5.1. Determinación de la demanda química de oxígeno	115
3.5.2. Determinación de sólidos	116
3.5.3. Determinación de nutrientes	116
3.5.4. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad	116
3.6. Análisis de las poblaciones microbianas	117
3.6.1. Extracción de ADN de las muestras	119
3.6.2. Amplificación y secuenciación del ADN	119
3.6.3. Tratamiento bioinformático de las secuencias	120
3.6.4. Biodiversidad y análisis estadístico	121
4. Resultados y discusión	131
4.1. Pretratamiento de la biomasa algal	131
4.1.1. Influencia del inóculo en la biodegradabilidad	132
4.1.2. Hidrólisis enzimática	135
4.1.3. Conclusiones de los pretratamientos	150
4.2. Digestión anaerobia de la biomasa algal en condiciones mesófilas	152
4.2.1. Caracterización de la biomasa algal empleada como sustrato	153
4.2.2. Estabilidad del proceso en los periodos de estudio	156
4.2.3. Efecto de las condiciones operacionales sobre la biodegradabilidad de la biomasa algal	160
4.2.4. Sólidos en el reactor y fangos producidos	176
4.2.5. Calidad del efluente	180
4.2.6. Conclusiones de la digestión anaerobia de microalgas en condiciones mesófilas	190
4.3. Digestión anaerobia de la biomasa algal en condiciones termófilas	192
4.3.1. Caracterización de las microalgas empleadas como sustrato	192
4.3.2. Identificación de los periodos pseudo-estacionarios	196
4.3.3. Efecto de las condiciones operacionales sobre la biodegradabilidad anaerobia	199
4.3.4. Sólidos en el reactor y producción de fangos	213

4.3.5. Calidad del efluente.....	218
4.3.6. Estudio de inhibición.....	222
4.3.7. Conclusiones de la digestión anaerobia termófila de biomasa algal	230
4.4. Caracterización de las poblaciones microbianas durante la digestión anaerobia de microalgas	233
4.4.1. Análisis de diversidad y similitud de las comunidades microbianas.....	237
4.4.2. Composición de la comunidad microbiana del reactor AnMBR mesófilo ..	243
4.4.3. Composición de la comunidad microbiana en el reactor CSTR termófilo ..	247
4.4.4. Comunidad de Bacterias y Archaeas en la biomasa algal	250
4.4.5. Conclusiones del análisis de las poblaciones microbianas	251
5. Conclusiones/Conclusions	256
6. Desarrollos futuros	272
7. Anexo	277
7.1. Nomenclatura.....	277
7.2. Métodos analíticos	280
7.2.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	280
7.2.2. Sólidos.....	281
7.2.3. Compuestos nitrogenados.....	282
7.2.4. Compuestos de fósforo.....	283
7.2.5. Sulfato	284
7.2.6. Ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) y alcalinidad (ALK).....	284
7.3. Relación de tablas	285
7.4. Relación de figuras.....	288
Bibliografía.....	296

Introducción

1. Introducción

El agua es un constituyente esencial en el desarrollo de la vida y es por ello que, a la hora de abordar los problemas medioambientales, el agua y la gestión de los recursos hídricos constituyen uno de los puntos más destacados, teniendo una importancia capital en el equilibrio económico, social y medioambiental.

Durante siglos, el ser humano ha hecho un uso extensivo del agua sin poner en riesgo su calidad ni comprometer ninguna de las fases que componen el ciclo hidrológico. Las presiones antropogénicas sobre los recursos naturales fueron menos profundas de forma que la atmósfera, la tierra y el agua del planeta podían soportar la carga impuesta por el consumo y la producción humana (UNEP, 2012). Sin embargo, en la actualidad, el crecimiento demográfico, la industrialización y la demanda cada vez más exigente de bienes y servicios por parte de la sociedad, ha dado lugar a un incremento en la producción de aguas residuales que, por cantidad y calidad, amenazan continuamente la integridad de acuíferos, ríos y aguas litorales, deteriorando un recurso tan escaso como el agua. Esta problemática asociada a la contaminación de las aguas ha impulsado la necesidad de tomar medidas en relación al tratamiento requerido previo a su vertido. De esta forma, el establecimiento de restricciones legales cada vez más exigentes para minimizar el impacto de la contaminación y la regularización de la reutilización de las aguas, ha hecho que se dedique un mayor esfuerzo a la mejora y el desarrollo de los procesos de depuración.

A su vez, dicho incremento de la población y del consumo per cápita rigen también la demanda energética global, cuyo abastecimiento depende principalmente de energía derivada de combustibles fósiles. No obstante, la incipiente escasez de estos combustibles pone en riesgo el abastecimiento energético en un futuro próximo, y su uso produce emisiones de gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático, provocando eventos meteorológicos extremos, pérdida de la cubierta de hielo, escasez de agua y aumento del nivel del mar (UNEP, 2012).

Este proceso de globalización ha llevado a la comunidad científica a desarrollar tecnologías más eficientes y sostenibles que frenen el deterioro del medio ambiente, entendiéndose por desarrollo sostenible la definición establecida en 1987 por la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, y aprobada en la Conferencia de las Naciones Unidas de Río de Janeiro en 1992: *“Satisfacer las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades”*.

Esta tendencia al desarrollo sostenible junto con la aparición de requisitos de vertido cada vez más exigentes ha incrementado la complejidad de los procesos de depuración. Así pues, los esfuerzos en depuración se están centrando fundamentalmente en el ahorro energético, la reducción de la dependencia energética de los combustibles fósiles y la recuperación de recursos.

1.1. Aguas residuales

1.1.1. Contaminación de las aguas

La contaminación del agua es debida a la introducción de impurezas que alteran su calidad, las cuales se consideran contaminantes cuando su concentración alcanza un nivel tal, que puede dañar la vida acuática, la salud pública o afectar negativamente a sus distintos usos. Esta contaminación puede proceder de fuentes naturales o de actividades humanas y, dado que normalmente las fuentes de contaminación natural son muy dispersas y no provocan concentraciones altas de polución, se considera la contaminación de origen antropogénico la responsable del mayor impacto. Así pues, las aguas contaminadas como consecuencia de la actividad humana se clasifican en dos grupos generales según su origen: aguas residuales urbanas o domésticas y aguas residuales industriales.

Las aguas residuales procedentes de las actividades domésticas están constituidas en su mayoría por sustancias biodegradables, y su composición depende básicamente

del nivel de vida, las costumbres, la climatología, la disponibilidad y el coste del agua. Por el contrario, las aguas residuales industriales presentan una composición muy diferente, dependiendo no solo de las distintas clases de industrias que las generan, sino también de los procesos de fabricación y las materias primas empleadas dentro de cada tipo de industria (Metcalf&Eddy, 2013).

Debido a las diferentes naturalezas del agua residual, existe una gran variedad de sustancias contaminantes, bien de naturaleza orgánica o inorgánica, que alteran las características físicas, químicas y biológicas del agua. Es por ello que estas aguas residuales deben ser sometidas a un tratamiento previo a su vertido que permita obtener un agua que reúna los criterios de calidad establecidos por la legislación vigente, con el fin de evitar desequilibrios en el medio receptor que den lugar a problemas tales como la eutrofización, provocada por un exceso de nutrientes, y la toxicidad debido al vertido de aguas residuales industriales que contienen contaminantes tales como metales y compuestos minerales.

1.1.2. El agua residual como fuente de recursos

Los problemas medioambientales a los que actualmente se enfrenta la sociedad se deben en gran medida a la sobreexplotación de los recursos naturales, incluidos los combustibles fósiles. Es por ello que el modelo de desarrollo económico actual, basado en el uso intensivo de los recursos, la generación de residuos y la contaminación, ha sido recientemente declarado como insostenible por la Agencia Europea del Medio Ambiente. Así mismo, la incipiente escasez de los combustibles fósiles junto con los problemas asociados a su uso, ha creado una urgente necesidad de encontrar fuentes de energía alternativas que sean capaces de abastecer la demanda energética mundial, mitigando los acusados problemas asociados al cambio climático y promoviendo así el desarrollo sostenible. Consecuentemente, la maximización de la eficiencia energética y la recuperación de recursos deben

considerarse como factores clave del nuevo modelo de desarrollo sostenible (Beuckels et al., 2015).

Este cambio de paradigma debe hacerse extensivo al tratamiento de residuos y aguas residuales. A pesar de que las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) se concibieron para eliminar contaminantes y así reducir el impacto medioambiental de las descargas municipales e industriales, en las últimas décadas las instalaciones se han visto complementadas con tratamientos avanzados que permiten el reciclado y reutilización del agua residual (Lyu et al., 2016), así como la recuperación de energía y materiales (Mo and Zhang, 2013) tales como biofertilizantes, bioplásticos o biofloculantes (Li and Yu, 2011; Pintilie et al., 2016). El continuo desarrollo y optimización de los procesos de tratamiento de residuos y recuperación de recursos está cambiando el concepto actual de estación depuradora de aguas residuales (WWTP – *WasteWater Treatment Plant*) hacia el de instalación de recuperación de recursos (WRRF – *Water Resource Recovery Facility*).

Actualmente, la recuperación energética de las aguas residuales a través de la producción de biogás mediante una digestión anaerobia, es una de las alternativas más estudiadas por la comunidad científica ya que puede transformarse un residuo en un recurso del que obtener energía. Sin embargo, no solo se están utilizando corrientes residuales como el agua residual, fango o los residuos sólidos urbanos (Giménez et al., 2011; Moñino et al., 2017) sino también biomasa lignocelulósica (Zamanzadeh et al., 2016), como materias primas a partir de las cuales incrementar la producción mundial de metano.

En concreto, el uso de biomasa para la producción de energía está recibiendo un creciente interés debido a la posibilidad de generar distintos biocombustibles a partir de ella, tales como bioetanol, biodiesel o biogás, así como otros productos de alto valor añadido (Mussnug et al., 2010).

1.2. Tratamientos biológicos convencionales de aguas residuales

El objetivo principal que persigue el tratamiento convencional de aguas residuales es la obtención de un vertido que no provoque graves impactos sobre el medio ambiente. El tipo y grado de tratamiento aplicado al agua residual dependerá tanto de su composición como del lugar donde se vaya a realizar la descarga del efluente. Por ello, es conveniente analizar las condiciones y necesidades locales de cada caso, teniendo en cuenta la legislación vigente.

Para conseguir el nivel adecuado de depuración, las EDAR se configuran incluyendo una serie de operaciones o procesos unitarios, clasificados en: *Operaciones unitarias físicas*, *Procesos unitarios químicos* y *Procesos unitarios biológicos*. De estos procesos, las técnicas de mayor implantación en depuradoras urbanas son las basadas en procesos biológicos intensivos. El principio de estos procesos es intensificar los fenómenos de transformación y eliminación de la materia orgánica que se desarrollan en la naturaleza, localizándolos sobre superficies reducidas.

Inicialmente, los tratamientos biológicos tuvieron como objetivo la eliminación de la materia orgánica de las aguas residuales. Sin embargo, a medida que se incrementó la problemática asociada a la eutrofización, como consecuencia de un exceso de nutrientes en los vertidos, se desarrollaron diferentes esquemas de tratamiento para eliminar también dichos nutrientes. Estos tratamientos biológicos utilizan reacciones asociadas a una gran variedad de microorganismos vivos, los cuales emplean los contaminantes o CO_2 como fuente de carbono para la síntesis de nueva materia celular y como fuente de energía para su metabolismo.

Los microorganismos que intervienen en los procesos biológicos se pueden clasificar según su fuente de carbono, denominándose *heterótrofos* a aquellos microorganismos que requieren de una fuente de carbono orgánico para su crecimiento celular, y *autótrofos* a los que precisan de una fuente de carbono

inorgánico como es el CO_2 . Sin embargo, no solo la fuente de carbono sino también el aceptor final de electrones empleado en el metabolismo microbiano, da lugar a una diferenciación de la biomasa. De esta forma, se denomina *biomasa aerobia* a aquellos microorganismos que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones, *biomasa facultativa* a aquellos que pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones pero en déficit de éste, pueden emplear otros compuestos como son el nitrito o el nitrato, y *biomasa anaerobia* a aquellos que utilizan diversos compuestos orgánicos, protones o sulfatos como aceptores de electrones. Estos microorganismos anaerobios no pueden emplear oxígeno o nitratos en su metabolismo, siendo la presencia de estos compuestos en el medio inhibitoria para la mayor parte de ellos. Así mismo, en función del medio de soporte donde se encuentran estos microorganismos en el reactor, los procesos biológicos se clasifican en dos grandes grupos: *Procesos de cultivo en suspensión*, donde los microorganismos se encuentran dispersos en un medio líquido, y *procesos de soporte sólido*, donde los microorganismos se encuentran fijos sobre un soporte inerte formando una película. De todos los procesos que se han desarrollado para el tratamiento de las aguas residuales, los sistemas de fangos activados y sus variantes constituyen las técnicas de tratamiento biológico más difundidas.

1.2.1. Tratamiento de las aguas residuales mediante fangos activados

Los fangos activados son procesos aerobios de cultivo en suspensión cuyo esquema habitual consta de un reactor continuo de mezcla completa (CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor*), donde la biomasa permanece en contacto con el agua a tratar un tiempo suficiente como para que se produzca la eliminación de la materia orgánica, y un decantador secundario donde se produce la separación física de la biomasa del efluente clarificado, tal y como se muestra en la Figura 1.1. Debido al continuo crecimiento de los microorganismos, una parte de esta biomasa sedimentada tiene que ser eliminada del proceso mediante una corriente de purga,

mientras que el resto de fangos se recirculan al reactor biológico. De esta forma, se consigue que el tiempo de permanencia de los microorganismos en el sistema sea mayor que el tiempo de retención del agua residual.

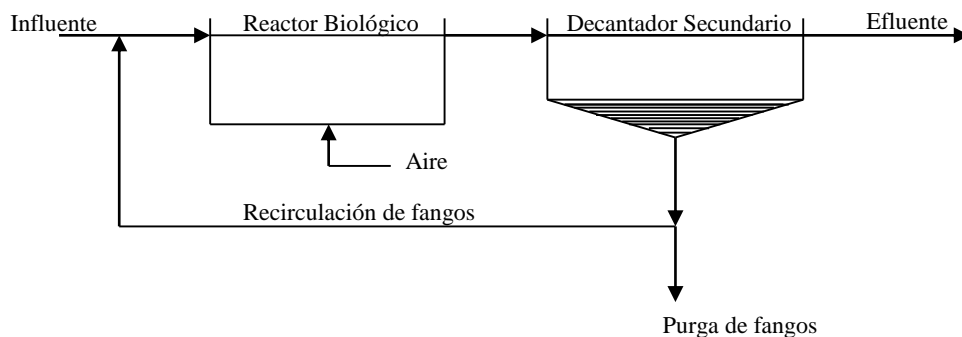


Figura 1.1. Esquema general de un tratamiento de fangos activados.

Pese a que este proceso es el más extendido en cuanto al tratamiento de aguas residuales en EDARs, presenta ciertas desventajas:

- Un proceso aerobio requiere del suministro de oxígeno (O_2) de forma continua y en unas concentraciones tales, que permitan el correcto funcionamiento del proceso biológico. Este suministro de O_2 se realiza normalmente mediante soplantes, que toman el aire atmosférico y lo impulsan a los reactores a través de difusores que aseguran la correcta distribución del aire. El funcionamiento de estas soplantes conlleva un consumo energético elevado, el cual puede llegar a superar el 60% del coste energético total de una EDAR (Lester et al., 2009).
- Dado que los microorganismos aerobios tienen un elevado rendimiento celular, el cual se define como la cantidad de biomasa generada por unidad de sustrato consumido (Ferrer and Seco, 2007), la mayoría de la energía obtenida de la degradación de materia orgánica es destinada a la generación de nuevas células. Esto da lugar a un elevado crecimiento de la biomasa y, por tanto, a una gran producción de fangos, los cuales necesitan ser estabilizados mediante un proceso de digestión.

- Los procesos aerobios pierden calor por transferencia con la atmósfera y contribuyen a la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs). Así mismo, el proceso biológico convencional para eliminar nitrógeno del agua, mediante la combinación de condiciones anóxicas y aerobias, da lugar a que éste sea liberado a la atmósfera en forma de N_2 sin posibilidad de ser recuperado como nutriente. A su vez, numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de importantes emisiones de N_2O asociadas a los procesos de eliminación biológica de nitrógeno (Kampschreur et al., 2009; Law et al., 2012).
- El efluente de un proceso de fangos activados puede requerir de un tratamiento terciario para eliminar microorganismos patógenos.

Estos inconvenientes que presenta la tecnología convencional de tratamiento de aguas residuales, hacen necesario el desarrollo de tecnologías alternativas que minimicen el consumo energético y maximicen la recuperación de recursos, tales como el agua y los nutrientes.

1.2.2. Estabilización de los fangos

Los fangos producidos en el tratamiento convencional de aguas residuales deben ser estabilizados antes de su evacuación, con el fin de eliminar su potencial de putrefacción y de producción de malos olores, así como de reducir la presencia de organismos patógenos. El proceso de estabilización se basa en la reducción de la fracción orgánica o volátil del fango, puesto que los microorganismos se desarrollan sobre dicha fracción. De entre los distintos métodos para llevar a cabo este proceso, tales como la estabilización térmica, estabilización con cal o con cloro gas y estabilización biológica, la reducción biológica de la fracción volátil del fango es uno de los más extendidos, llevándose a cabo mediante una digestión, bien sea aerobia o anaerobia, en reactores continuos de tanque agitado.

Digestión aerobia. La digestión aerobia de los fangos biológicos procedentes de la depuración de las aguas residuales permite generar un producto estable, que puede ser llevado a vertedero o utilizado como fertilizante, y reducir la masa y el volumen que debe verterse. Para ello, se lleva a cabo un proceso de fangos activados extendido en el que se degrada el protoplasma celular y la materia orgánica biodegradable que todavía se encuentra presente en el sistema. Este proceso es realizado por microorganismos aerobios y facultativos que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo, debido a los elevados costes energéticos que supone este tratamiento, la estabilización aerobia suele utilizarse en EDARs de tamaño medio o pequeño, con bajas cargas orgánicas.

Digestión anaerobia. A diferencia de la digestión aerobia, la digestión anaerobia es un proceso fermentativo donde la descomposición de la materia orgánica presente en los fangos tiene lugar en ausencia de oxígeno. Este proceso se caracteriza por la transformación de dicha materia orgánica en metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) y un producto inerte, mediante la interacción de una diversa población microbiana. Los digestores anaerobios requieren altos tiempos de retención celular (TRC) para conseguir una elevada eliminación de materia orgánica y, por tanto, requieren un previo espesado de los fangos así como elevadas temperaturas de operación con el fin de reducir el volumen a tratar. Dada la complejidad técnica de este proceso, la digestión anaerobia es comúnmente aplicada en plantas depuradoras de gran tamaño.

1.3. Tratamientos anaerobios de aguas residuales

Los tratamientos anaerobios han sido ampliamente utilizados en la estabilización de fangos concentrados, producidos en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, su aplicación puede extenderse al tratamiento de aguas residuales de alta carga y, en una menor proporción pero con una tendencia en aumento significativa, para el tratamiento de residuos orgánicos diluidos como es el caso de las aguas residuales

domésticas. La producción de biogás como resultado de una transformación anaerobia de la materia orgánica, ha suscitado un creciente interés debido al potencial energético de esta corriente. De esta forma, no solo agua residual sino también corrientes de residuos con distintos orígenes están siendo estudiadas como sustratos para la producción de biogás.

El tratamiento anaerobio de un residuo orgánico presenta una serie de ventajas e inconvenientes en comparación con el tratamiento aerobio convencional, los cuales se detallan en la Tabla 1.1. Así pues, el éxito de la implementación de un determinado tratamiento anaerobio de aguas residuales, pasará por la consideración de las principales características que lo diferencian de un proceso aerobio como son la mayor sensibilidad a las variaciones de pH y temperatura, la necesidad de trabajar a elevados tiempos de retención celular y/o temperaturas y la baja sedimentabilidad que presentan los fangos anaerobios.

Tabla 1.1. Ventajas e inconvenientes del tratamiento anaerobio de materia orgánica en comparación con el tratamiento aerobio (Adaptado de Seghezzi, 2004).

Desventajas
<i>Elevados tiempo de retención celular.</i> El lento crecimiento de la biomasa anaerobia obliga a trabajar con tiempos de retención elevados para conseguir un buen rendimiento en el proceso.
<i>Elevados volúmenes.</i> En los tratamientos anaerobios convencionales no existe una recirculación de fangos al digestor, siendo iguales el tiempo de retención hidráulico y el celular, por lo que emplear elevados tiempos de retención conlleva también el incremento del volumen de trabajo.
<i>Temperatura elevada.</i> Con el fin de reducir los elevados volúmenes necesarios, los digestores suelen operarse en intervalos de temperatura mesofílicos (30-40°C) o termofílicos (50-57°C), lo que implica un coste energético por tener que calentar el fango.
<i>Arranque de reactores anaerobios.</i> La baja tasa de crecimiento de estos microorganismos da lugar a que el proceso de arranque del reactor requiera de largos periodos de tiempo, que dependerán de la calidad y cantidad de inóculo utilizado. Por ello, el arranque de reactores anaerobios requiere de herramientas apropiadas para la obtención y evaluación de los inóculos más adecuados.
<i>Post-tratamiento.</i> Los tratamientos anaerobios no son capaces de eliminar los nutrientes del medio y, generalmente, su efluente contiene también materia orgánica y organismos patógenos. Es por ello que el efluente de un tratamiento anaerobio requiere de un post-tratamiento que permita cumplir los requisitos legales de vertido.
Ventajas
<i>Bajas producciones de fango.</i> La baja tasa de crecimiento de estos microorganismos implica que sólo una parte del residuo orgánico biodegradable está siendo sintetizado en forma de nuevas células, produciéndose una menor cantidad de fango que en un tratamiento aerobio.
<i>Menor consumo energético.</i> Los tratamientos anaerobios presentan menores costes energéticos en comparación con los procesos aerobios, puesto que carecen de aireación. Así mismo, el consumo que puedan tener por las necesidades propias de operación puede ser abastecido gracias a la generación de metano. Mediante la acción de las archaeas metanogénicas, la mayor parte del residuo orgánico se transforma en metano, un gas combustible a partir del cual se puede obtener energía.
<i>Fango estabilizado.</i> A causa de la baja tasa de crecimiento celular y de la conversión de la materia orgánica en CH ₄ y CO ₂ , la materia sólida resultante suele estar bien estabilizada. Esto la convierte, tras un proceso de deshidratación o secado, en un material apto para su evacuación a vertedero, para el compostaje o para su aplicación agrícola.
<i>Eficiencia.</i> Se pueden alcanzar elevados rendimientos de eliminación de materia orgánica operando los reactores bajo las condiciones apropiadas.
<i>Baja necesidad de nutrientes.</i> Las bajas necesidades de nitrógeno y fósforo vienen derivadas de los bajos índices de producción de biomasa que presentan los microorganismos anaerobios.
<i>Superficie.</i> Operando los reactores con elevadas cargas orgánicas y/o haciendo uso de configuraciones avanzadas, éstos requieren de menores necesidades de espacio que los tratamientos aerobios convencionales.

1.3.1. Procesos implicados en la degradación anaerobia de la materia orgánica

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo, caracterizado por una amplia variedad de reacciones bioquímicas necesarias para su transformación hasta el producto final, generalmente metano y dióxido de carbono. Estas reacciones se asocian al metabolismo de diversos grupos de microorganismos que interaccionan entre sí de forma sintrófica, basándose en una interdependencia nutritiva en la que la actividad de un grupo es dependiente de la del otro. Así pues, se entiende un proceso anaerobio como una secuencia de etapas consecutivas y simultáneas donde los productos de una etapa se utilizan como sustratos de la etapa siguiente.

De manera general, el proceso anaerobio puede dividirse en cuatro etapas: *hidrólisis*, *acidogénesis*, *acetogénesis* y *metanogénesis* compuestas por siete procesos (Batstone et al., 2002), tal y como se muestra en la Figura 1.2.

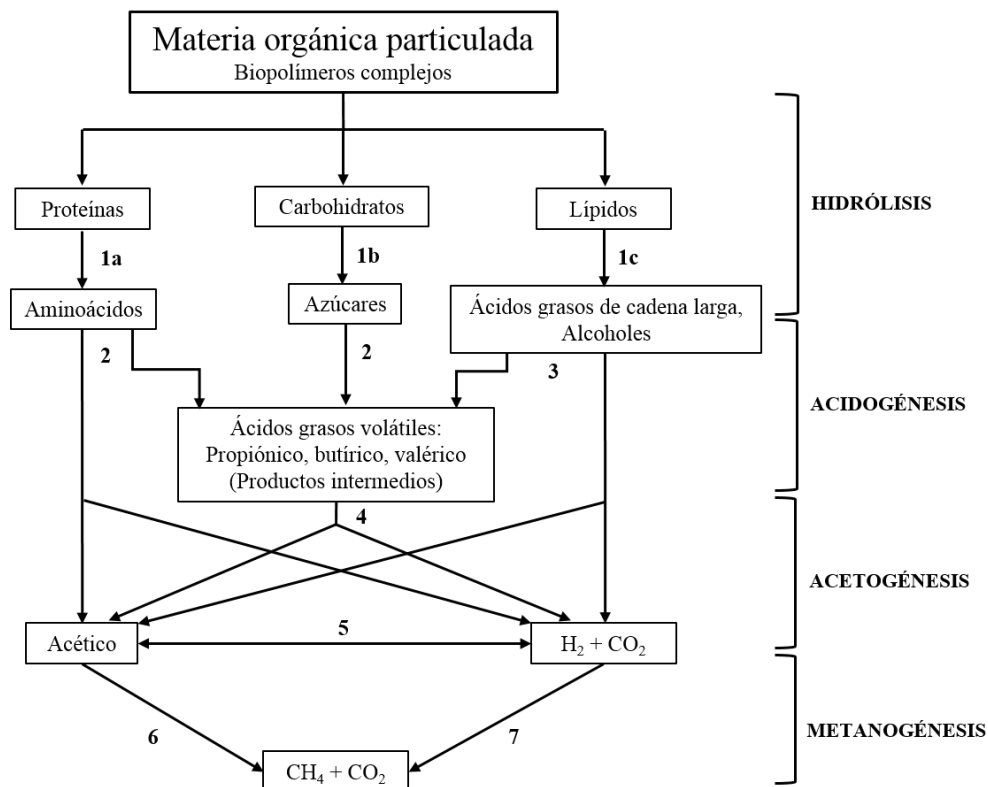


Figura 1.2. Esquema de las etapas de la degradación anaerobia de materia orgánica. Los procesos involucrados en cada etapa han sido enumerados 1-7 (Adaptado de Batstone et al., 2002).

1.3.1.1. Hidrólisis

En esta primera etapa de la degradación anaerobia, los compuestos orgánicos complejos formados por proteínas, carbohidratos y lípidos, son degradados a moléculas de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y alcoholes. Esta desintegración es llevada a cabo por diferentes grupos de bacterias hidrolíticas a través de la excreción de enzimas extracelulares (Kaseng et al., 1992). De los microorganismos involucrados en esta etapa, las bacterias proteolíticas son las responsables de la producción de enzimas proteasas que catalizan las hidrólisis de proteínas en aminoácidos (Figura 1.2, proceso 1a); las celulolíticas y xilenolíticas producen celulasa y xilanasas para degradar la celulosa y

el xileno (ambos carbohidratos) en glucosa y xilosa, respectivamente (Figura 1.2, proceso 1b); y las bacterias lipídicas degradan los lípidos a glicerol y ácidos grasos de cadena larga mediante enzimas lipasas (Figura 1.2, proceso 1c). Los productos de los procesos de hidrólisis son consumidos como sustratos por organismos anaerobios fermentativos o anaerobios oxidadores (Demirel and Scherer, 2008), que los emplean como fuente de energía y poder reductor en las etapas sucesivas.

La velocidad del proceso de hidrólisis depende fundamentalmente del pH, de la temperatura, del tipo de sustrato, y de la concentración de biomasa con actividad hidrolítica en el sistema (Batstone et al., 2002; Hagos et al., 2016; Kiran et al., 2016), siendo la etapa limitante del proceso en corrientes con elevada presencia de material orgánico particulado (Pavlostathis and Giraldo-Gómez, 1991) y de difícil degradación.

Las bacterias que poseen enzimas hidrolíticas para poder llevar a cabo este proceso son anaerobias facultativas, cuyos géneros más comunes pertenecen a los phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi y Proteobacteria (Rivière et al., 2009; Sundberg et al., 2013). El género *Clostridium* conforma unas de las bacterias celulolíticas más abundantes (Geng et al., 2010; Germane et al., 2015) junto con *Acetivibrio* y *Bacteroides*. Las bacterias con actividad proteolítica son especies pertenecientes también al género *Clostridium*, así como a los géneros *Proteus* y *Coprothermobacter* (Sasaki et al., 2011); mientras *Anaerovibrio* es uno de los géneros que presenta una alta actividad lipídica (Privé et al., 2013). Sin embargo, la comunidad microbiana que se establece en un reactor anaerobio depende fuertemente de la composición del sustrato a degradar, así como de las condiciones operacionales fijadas, puesto que ambos factores promoverán la dominancia de unos microorganismos sobre otros.

1.3.1.2. Acidogénesis

La acidogénesis es un proceso fermentativo, caracterizado por la degradación de los azúcares y de los aminoácidos producidos en la etapa de hidrólisis (Figura 1.2, proceso 2) en ausencia de aceptores o dadores de electrones externos. Este proceso da lugar a la aparición de compuestos orgánicos intermedios más reducidos (propiónico, butírico, láctico, etanol) y a precursores directos de la formación de metano como son el acético y el hidrógeno (H_2) y CO_2 (Gujer and Zehnder, 1983; Speece, 1996). Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H_2 por parte de los microorganismos, de forma que cuando el H_2 es eliminado del medio eficientemente, las bacterias fermentativas no producen etanol, favoreciéndose la producción de H_2 y la liberación de energía en forma de ATP (Gallert and Winter, 2005). La acidogénesis es considerada la etapa más rápida de la degradación anaerobia y los microorganismos involucrados en este proceso son los menos sensibles a la inhibición (Mata-Alvárez, 2003).

La **fermentación de azúcares** se realiza por distintas rutas metabólicas en función del microorganismo responsable: Ruta de Embden-Meyhof-Parnas (EMP), ruta de pentosa fosfato (PF), ruta de Etner-Doudoroff (ED) y la ruta de la fosfoelotalasa o de Warburg-Dickens (WD). De las cuatro rutas posibles, la más habitual es la de EMP, también llamada glicólisis. En la glicólisis, la glucosa es transformada mediante una serie de reacciones enzimáticas en piruvato y dos equivalentes reducidos de NADH, los cuales producirán cuatro moléculas de ATP al introducirse en la cadena respiratoria (Madigan et al., 2009). Esta degradación de la glucosa puede ser dividida en dos fases, tal y como se esquematiza en la Figura 1.3.

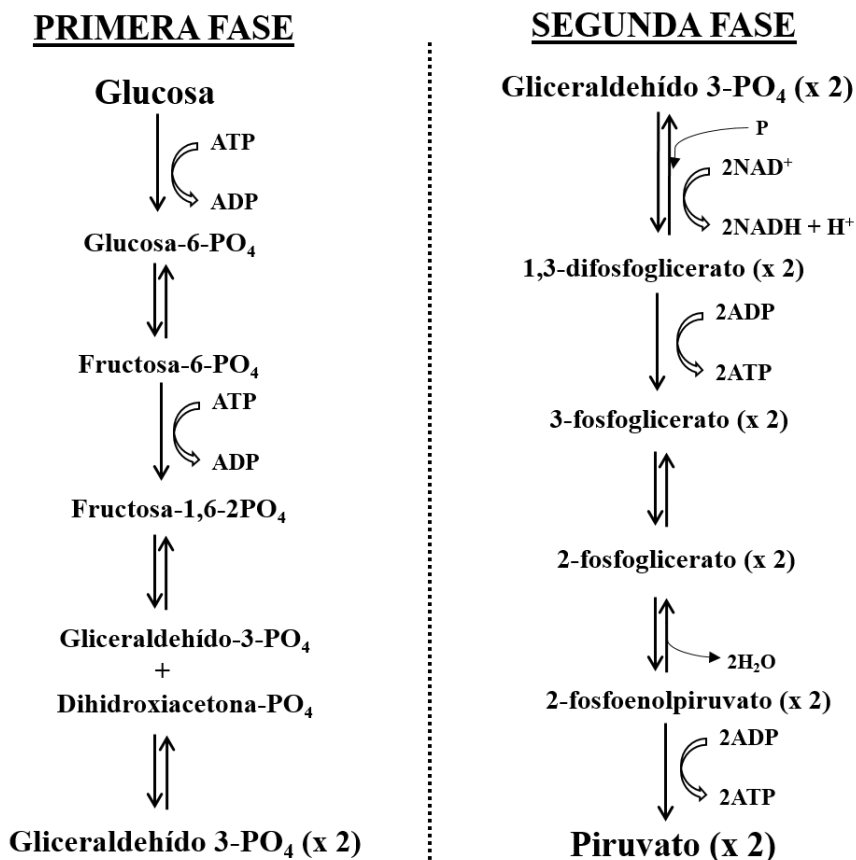


Figura 1.3. Esquema de la ruta de Embden-Meyhof-Parnas para la fermentación de azúcares (Adaptado de Madigan et al., 2009).

La primera fase consta de una serie de reacciones preparatorias que no implican óxido-reducción y que conducen a la producción del intermediario clave, el gliceraldehído-3-fosfato, mediante el consumo de energía en forma de 2 moléculas de ATP. En la segunda fase tienen lugar reacciones de oxidación-reducción, en las que se origina la producción de energía, formándose 4 moléculas de ATP y 2 de piruvato por cada molécula de glucosa oxidada (Figura 1.3). La reducción del piruvato producido en la glicólisis, dará lugar a un producto final que dependerá del sustrato y la población microbiana establecida en el sistema anaerobio, así como de las condiciones ambientales del medio en el que se hallen. La Figura 1.4 muestra los

principales productos finales que podrían obtenerse de la fermentación de azúcares: H_2 y CO_2 , lactato, etanol, acetato, butirato y propionato.

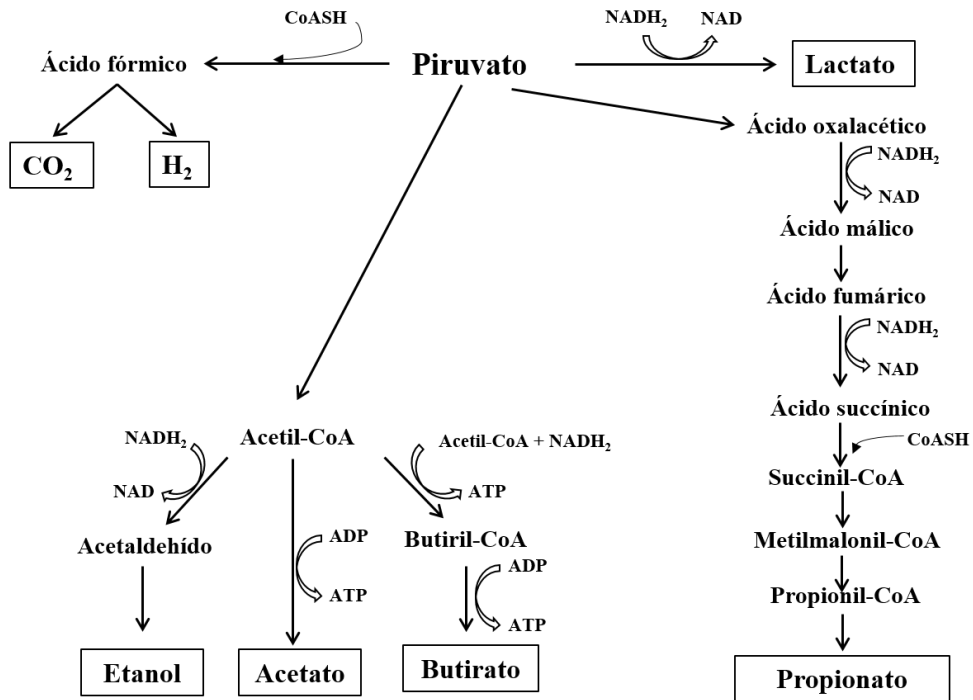


Figura 1.4. Posibles rutas metabólicas del piruvato (Ácido pirúvico) (Adaptado de Madigan et al., 2009).

De igual forma, los productos finales de la **fermentación de aminoácidos** también dependen de las características del sustrato y de la comunidad microbiana establecida, pudiéndose producir NH_3 , CO_2 , H_2 , H_2S y ácidos grasos volátiles. Esta fermentación puede llevarse a cabo sobre aminoácidos individuales, los cuales se metabolizan para finalmente producir un Acetil-CoA, derivado de ácidos grasos, y ATP por fosforilación a nivel de sustrato, así como NH_3 y CO_2 . Una ruta alternativa es la fermentación acoplada de aminoácidos, conocida como reacción de *Stickland*. En esta reacción, uno de los aminoácidos funciona como dador de electrones, oxidándose, y el otro funciona como aceptor de electrones, reduciéndose, dando como resultado NH_3 , CO_2 y ácidos carboxílicos. Por último, la reacción conocida

como *Desaminación/Transaminación*, fermenta aminoácidos alifáticos dando lugar a ácido pirúvico, el cual se incorpora al ciclo glicolítico mostrado en la Figura 1.4 (Madigan et al., 2009).

Las bacterias involucradas en esta etapa incluyen una amplia variedad de organismos fermentativos, anaerobios obligados y anaerobios facultativos, los cuales pertenecen mayoritariamente a los phyla Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, siendo los géneros más habituales los siguientes: *Clostridium*, *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Thermobacteroides*, *Streptococcus* y *Enterobacter* entre otros (Mara and Horan, 2003).

1.3.1.3. Acetogénesis

La acetogénesis es un proceso que engloba las reacciones de degradación de los productos de las etapas anteriores, bien sean los productos intermedios de la etapa acidogénica o bien los ácidos de cadena larga producidos en la hidrólisis de lípidos, manteniendo a su vez una determinada sinergia con procesos posteriores. A diferencia de los procesos de fermentación, estas reacciones producen la mayor parte de hidrógeno presente en el sistema. La proporción de H₂ formado en esta fase cobra una gran relevancia para el proceso global, puesto que determinará la proporción de acético en el sistema y, por tanto, la ruta metabólica dominante de producción de metano.

La degradación de los *ácidos grasos de cadena larga* se lleva a cabo mediante una oxidación anaerobia (Figura 1.2, proceso 3) denominada ***β-oxidación*** (Figura 1.5), donde no participan dadores o aceptores de electrones internos.

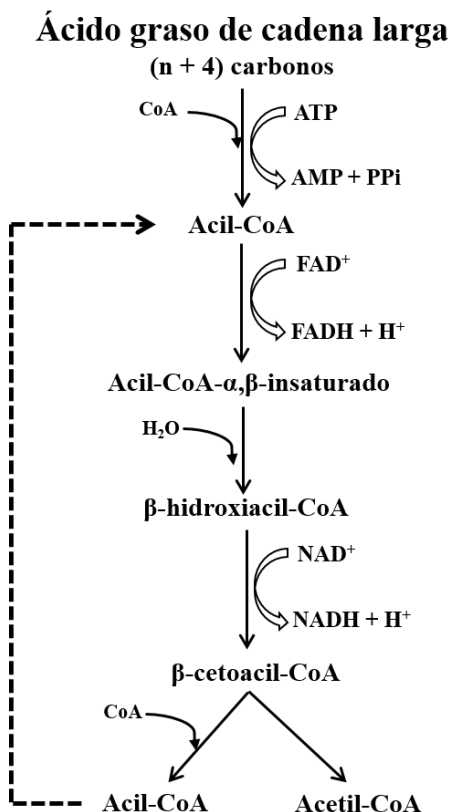


Figura 1.5. Esquema de la ruta metabólica denominada β -oxidación (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Los principales productos de esta ruta metabólica son ácidos grasos de cadena corta y precursores directos de metano: hidrógeno, dióxido de carbono y acético. Para que este proceso pueda producirse, las bacterias acetogénicas y los microorganismos consumidores de hidrógeno deben coexistir en una relación sinérgica. Las reacciones asociadas a la oxidación anaerobia de los ácidos grasos son termodinámicamente desfavorables a elevadas presiones parciales de H_2 , por lo que este gas es uno de los mayores inhibidores del proceso. Sin embargo, los microorganismos hidrogenotróficos son capaces de metabolizar el H_2 a muy bajas presiones parciales

(3-7 Pa), como se muestra en la Tabla 1.2, siendo su presencia necesaria para que el proceso tenga lugar (Cord-Ruwisch et al., 1988).

En la Tabla 1.2, en la que se muestra el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) para las reacciones de fermentación, metanogénesis y acetogénesis, las reacciones cuyo signo es negativo son termodinámicamente favorables, es decir, ocurren espontáneamente en la dirección dada hasta alcanzar un estado energético estable. Por el contrario, el signo positivo de ΔG indica que la reacción no es espontánea y que requiere el aporte de un mínimo de energía para que tenga lugar.

Tabla 1.2. Reacciones típicas en la degradación de la materia orgánica a CH_4 y CO_2 (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Tipo de reacción	Reacción	$\Delta G^{(1)}$
Fermentación de glucosa a acetato, H_2 y CO_2	$\text{Glucosa} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato}^- + 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	-207
Fermentación de glucosa a butirato, CO_2 e H_2	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Butirato}^- + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-135
Fermentación de butirato a acetato e H_2	$\text{Butirato}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	48.2
Fermentación de propionato a acetato, CO_2 e H_2	$\text{Propionato}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	76.2
Fermentación de etanol a acetato e H_2	$\text{Etanol} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato}^- + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	19.4
Metanogénesis a partir de H_2 y CO_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-136
Metanogénesis a partir de acetato	$\text{Acetato}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31
Acetogénesis a partir de H_2 y CO_2	$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acetato}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-105

⁽¹⁾ Incremento de energía libre de Gibbs (kJ/reacción) en condiciones estándar: solutos a 1 M y pH 7, gases a 1 atm y a 25 °C.

Los *productos intermedios* de la etapa de acidogénesis son también degradados mediante **oxidación anaerobia** vía **β -oxidación** (Figura 1.2, proceso 4). Gracias a este proceso, los ácidos grasos volátiles son transformados a productos más simples

que pueden ser metabolizados por los organismos metanógenos: acetato, H_2 y CO_2 . De la misma forma que el proceso anterior, a presiones parciales de hidrógeno bajas, estas reacciones se vuelven termodinámicamente favorables (Tabla 1.2), siendo suficiente el incremento de energía libre para permitir el crecimiento microbiano y la síntesis de ATP.

Por último, el ácido acético también puede producirse a partir de la reducción del CO_2 e H_2 mediante un proceso autótrofo que recibe el nombre de **homoacetogénesis** (Figura 1.2, proceso 5). Sin embargo, en condiciones de operación mesófilas ($35^\circ C$), las bacterias homoacetogénicas necesitan concentraciones de H_2 mucho más elevadas (520-950 ppm) que las metanogénicas. Por tanto, estos microorganismos no pueden proliferar en ambientes donde se desarrolle la biomasa metanógena hidrogenotrófica (Batstone et al., 2002).

Las bacterias acetogénicas son organismos sintróficos y anaerobios estrictos que pueden ser clasificados en dos grupos, el denominado SAO (*Syntrophic Acetate-Oxidizing bacteria*), que solo pueden crecer en presencia de organismos consumidores de hidrógeno como son las archaeas metanogénicas o las bacterias sulfato-reductoras, y el de organismos homoacetógenos (Mara and Horan, 2003). Las bacterias acetotróficas más representativas pertenecen a los siguientes géneros: *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* y *Acetobacterium* (Hattori, 2008; Weiland, 2010). Entre las bacterias homoacetogénicas, capaces de producir acetato a partir de CO_2 e H_2 , son habituales los géneros *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum* (Rincón et al., 2012).

1.3.1.4. Metanogénesis

La metanogénesis es la última etapa del proceso anaerobio, donde los productos de las etapas anteriores son transformados en metano y otros productos simples como CO_2 y H_2O , mediante organismos anaerobios estrictos. La formación de metano se produce por tres mecanismos distintos: hidrogenotrófico, acetoclástico y

metilotrófico, de los cuales los dos primeros abarcan prácticamente la totalidad del proceso.

En la **metanogénesis hidrogenotrófica** (Figura 1.2, proceso 7), el metano es formado a partir de la reducción del CO_2 usando electrones derivados de la oxidación del H_2 , siguiendo el esquema mostrado en la Figura 1.6. Generalmente, el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica genera una tercera parte del metano total producido en el proceso (Krumböck and Conrad, 1991), siendo las dos terceras partes restantes producidas a partir de ácido acético.

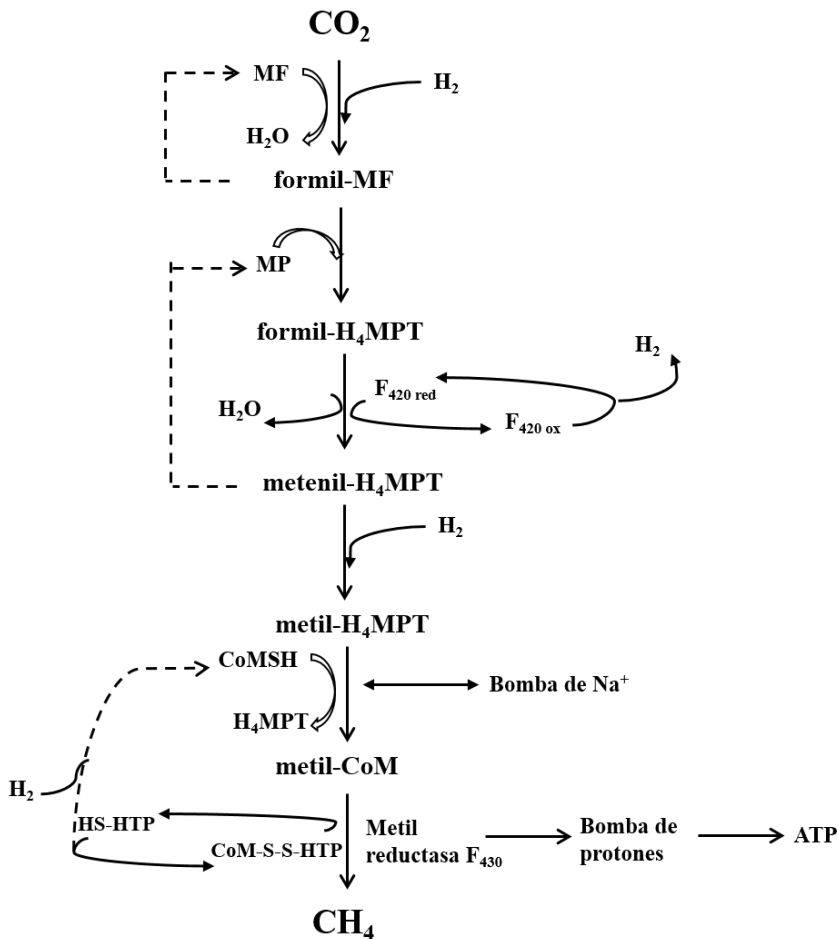


Figura 1.6. Esquema de la ruta metabólica de la producción hidrogenotrófica de metano (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, esta etapa es vital para la regulación de la presión parcial de hidrógeno del proceso. Es por ello, que los procesos asociados a las bacterias productoras de hidrógeno en la acidogénesis (vía fermentativa) y en la acetogénesis (vía oxidación anaerobia), presentan una sinergia con los procesos asociados a los metanógenos hidrogenotróficos.

La **metanogénesis acetoclástica** da lugar a metano y CO_2 a partir de ácido acético, como se muestra en la Figura 1.7.

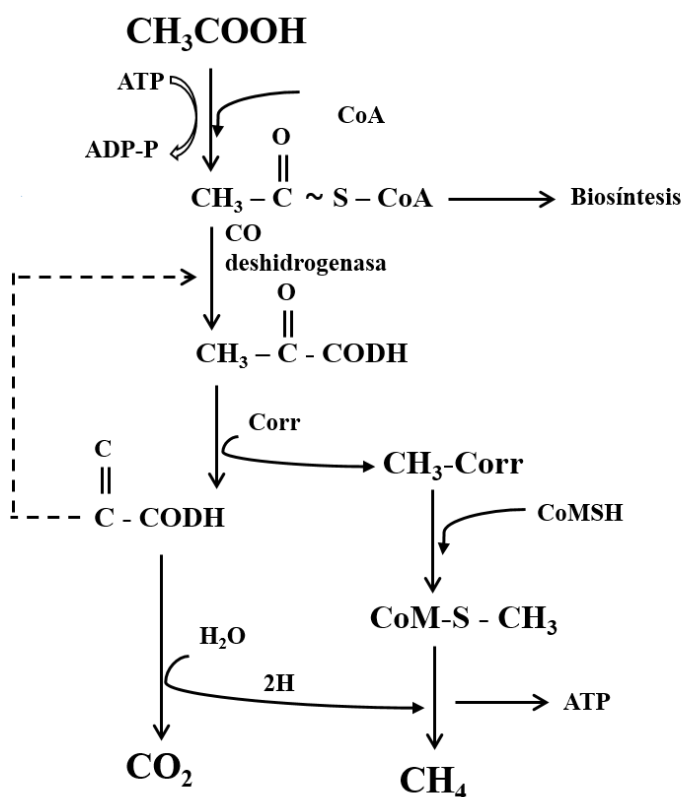


Figura 1.7. Producción de metano y CO_2 vía metanogénesis acetoclástica (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Esta ruta metabólica es la responsable de la mayor parte de la producción de metano en condiciones estándar. Sin embargo, sin la presencia de organismos consumidores

de H_2 , la presión parcial de este gas alcanzaría valores inhibitorios, dando lugar a una acumulación de ácidos en el sistema que harían descender el pH y provocar la inestabilidad del proceso anaerobio. La predominancia de esta ruta metabólica está altamente influenciada por las condiciones operacionales y las características del medio, puesto que elevadas temperaturas de operación y/o elevadas concentraciones de amonio pueden dar lugar al establecimiento de distintas poblaciones microbianas (Karakashev et al., 2005). De hecho, una ruta alternativa a la producción de metano es la llevada a cabo por los microorganismos SAO. En esta ruta, el acetato es convertido a H_2 y CO_2 para posteriormente ser utilizado por los metanógenos hidrogenotróficos (Schnürer and Nordberg, 2008). El desarrollo de los microorganismos SAO solo ocurre cuando las concentraciones de amonio alcanzan valores inhibitorios para los metanógenos acetoclásticos, ya que los SAO necesitan una media de 28 días para desarrollarse frente a un máximo de 12 días que necesitan los microorganismos acetoclásticos (Ek et al., 2011; Schnürer et al., 1994).

Paralelamente, existe un proceso que, pese a que también consume H_2 y podría favorecer el equilibrio en el sistema, a su vez también es competidor directo de la producción de metano. Los influentes con presencia de sulfatos propician el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras (SRB – *Sulfate-Reducing Bacteria*) que compiten por el sustrato tanto con los metanógenos como con los organismos acidogénicos y acetogénicos. Las SRB transforman los sulfatos a sulfuros y ácido sulfhídrico (H_2S), empleando como sustratos H_2 , acético, propiónico, butírico y láctico entre otros y, por tanto, compitiendo en la mayoría de los procesos implicados en la degradación anaerobia.

Los organismos metanógenos representan el más amplio y diverso grupo dentro del dominio Archaea. Las archaeas metanogénicas son estrictamente anaerobias y obtienen su energía de un restringido número de sustratos. De las archaeas taxonómicamente clasificadas, solo unas pocas pueden considerarse acetoclásticas. Del orden Methanosarcinales, las archaeas del género *Methanosarcina* son capaces

de producir metano bien a partir de H_2 y CO_2 o bien a partir de acetato, mientras que las del genero *Methanosaeta* son acetotróficas obligadas. Sin embargo, una amplia variedad de archaeas son capaces de generar metano a partir de H_2 y CO_2 , siendo éstas pertenecientes a los órdenes Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales. En cuanto a las SRB, normalmente se dividen en oxidadores completos, principalmente representados por la familia Desulfobacteraceae, y en oxidadores incompletos, tales como los pertenecientes al orden Desulfovibrionales y a la familia Desulfobulbaceae. De entre estos microorganismos se descubrió que algunos géneros eran capaces de degradar la celulosa, tales como *Desulfovibrio*, el cual es capaz de utilizar poliglucosa y nitrocelulosa como fuente de carbono (Petrova et al., 2002).

En general, la degradación anaerobia de biomasa compleja hasta CH_4 y CO_2 está comprendida por un amplio rango de microorganismos que interactúan de diferentes maneras, desde la competición hasta el sinergismo, dando lugar a una compleja ecología microbiana, cuyo estudio es necesario para la comprensión y optimización del proceso.

1.3.2. Parámetros que afectan al proceso anaerobio

El desarrollo de una adecuada población microbiana y el mantenimiento de unas condiciones que favorezcan su crecimiento, constituyen el principio fundamental de un proceso biológico. De esta forma, un balance óptimo entre los distintos microorganismos maximizará la eficiencia del proceso anaerobio de conversión de materia orgánica en metano.

El conocimiento de los parámetros, tanto ambientales como operacionales, y la influencia de éstos sobre el proceso, permiten el control del mismo evitando una desestabilización del sistema. En la operación de reactores anaerobios, la estabilidad es particularmente importante ya que, debido a la lenta dinámica del sistema, una desestabilización en su funcionamiento puede llevar a largos periodos de inactividad

microbiana. Es por ello que, a continuación, se explican los parámetros que afectan a un proceso anaerobio en mayor medida.

Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros que mayor influencia tiene en el proceso anaerobio ya que afecta a la velocidad de crecimiento de los microorganismos, tal y como se muestra en la Figura 1.8, así como a la actividad enzimática y a las características físico-químicas del sistema (Kiran et al., 2016).

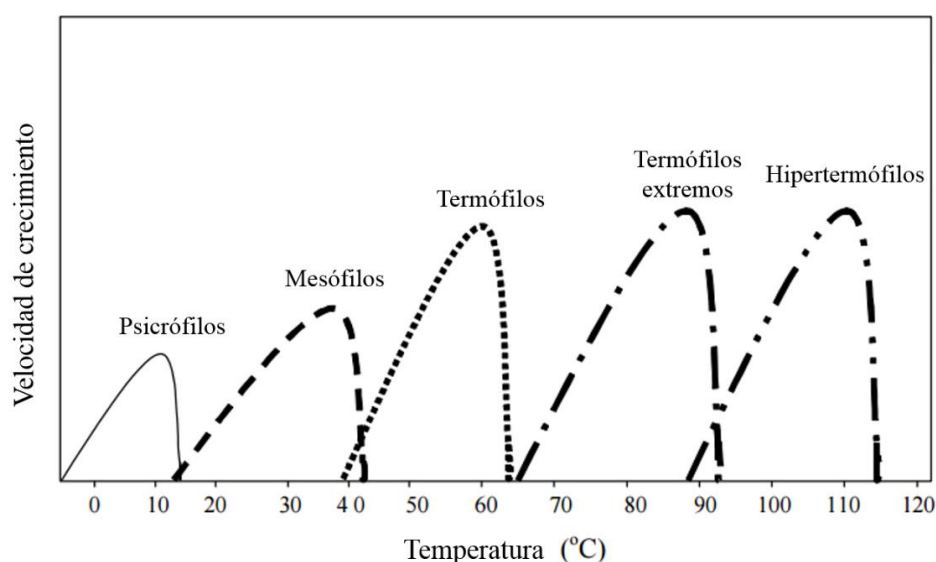


Figura 1.8. Relación entre la velocidad de crecimiento de los microorganismos y la temperatura (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Generalmente, la tasa máxima de crecimiento específico y de utilización de sustrato, es menor cuanto menor es la temperatura de operación. Los procesos anaerobios suelen llevarse a cabo en tres rangos de temperatura: *psicrófilo*, *mesófilo* y *termófilo*. Convencionalmente, las condiciones de operación mesófilas son las más utilizadas, debido a que en rangos de temperatura psicrófilos los microorganismos presentan una actividad metabólica significativamente más baja. Esta baja actividad obliga a trabajar a elevados TRC y, por tanto, al no existir recirculación del fango, a

incrementar el volumen de reacción. Sin embargo, el uso de tecnologías avanzadas para la digestión anaerobia que permiten desacoplar el TRC y el TRH, como la incorporación de membranas, ha dado lugar a estudios que han demostrado elevadas eficiencias de conversión de la materia orgánica en metano bajo condiciones psicrófilas (Giménez et al., 2011). Por el contrario, en condiciones termófilas los microorganismos presentan una mayor actividad, dando lugar a mayores conversiones de la materia orgánica en metano y a altas eficiencias de eliminación de patógenos. No obstante, pese a las ventajas que supone trabajar a elevadas temperaturas de operación, estos sistemas tienen márgenes de variación más estrictos, siendo especialmente sensibles a las fluctuaciones de temperatura y pH y, consecuentemente, proclives a presentar inestabilidades (Ahring et al., 2001). La inestabilidad de los procesos termófilos está asociada a su baja diversidad microbiana en comparación con los procesos mesófilos, ya que existe una menor variedad de microorganismos capaces de soportar ese rango de temperatura y, por tanto, de amortiguar las variaciones (Hagos et al., 2016). Además, incrementar la temperatura de operación del sistema también implica incrementar los costes energéticos.

En cuanto a las características físico-químicas del sistema, el incremento de temperatura disminuye la solubilidad de los gases. Así pues, cuanto menor es la temperatura de operación, mayores serán las concentraciones de gases disueltos en el efluente (CH_4 , H_2S , H_2 y CO_2). Esta variación de la solubilidad con la temperatura afecta también a las relaciones ácido-base. El incremento del CO_2 disuelto cuando la temperatura de operación es baja, produce un descenso del pH que afecta a los equilibrios $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ y $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, y de los ácidos grasos volátiles presentes en el reactor. Sin embargo, a elevadas temperaturas de operación, estos equilibrios se ven desplazados hacia sus formas no ionizadas, las cuales son más tóxicas para la biomasa anaerobia que las formas ionizadas (Khanal et al., 2017).

pH y alcalinidad

Los distintos microorganismos involucrados en el proceso anaerobio presentan su actividad metabólica óptima en diferentes rangos de pH, aunque estos rangos son muy cercanos entre sí, considerándose el pH óptimo del proceso alrededor de 7. Los microorganismos hidrolíticos presentan su óptimo entre 7 y 7.4, mientras que los acidogénicos tienen su óptimo en 6, los acetogénicos entre 7 y 7.2 y los metanogénicos entre 6.5 y 7.5. Los microorganismos metanógenos son los más sensibles a las variaciones de pH, por lo que a valores de pH inferiores a 6.5, la actividad metanogénica desciende bruscamente (Hagos et al., 2016). Es por ello que, para que un proceso anaerobio proporcione resultados satisfactorios, debe existir una sinergia entre los microorganismos productores y consumidores de especies acidificantes, fundamentalmente ácidos grasos volátiles (AGV). Uno de los principales problemas que se producen en los procesos anaerobios, es la acumulación de un exceso de estos ácidos en el reactor, ya que puede ocasionar problemas de acidificación, provocando dicha disminución de la actividad metanogénica. Esto daría lugar a un incremento paulatino de los ácidos en el reactor, disminuyendo todavía más el pH. La acidificación del medio puede llegar a ser tal, que se anule toda actividad biológica en el proceso.

Este tipo de situaciones no deseables pueden producirse más lentamente o incluso evitarse, si el proceso tiene una adecuada alcalinidad, capaz de amortiguar las variaciones de pH. La alcalinidad, o capacidad tampón del medio, es proporcionada por un amplio conjunto de compuestos. A pH próximos a la neutralidad, el sistema químico que controla mayoritariamente el pH es el formado por dióxido de carbono/bicarbonato. No obstante, otros equilibrios ácido-base, tales como el amonio/amoníaco, también influyen en el mantenimiento del pH. La capacidad tamponante del proceso puede evaluarse en función de la relación entre la alcalinidad intermedia (ALK_I), correspondiente a la de los ácidos grasos volátiles, y la alcalinidad total (ALK_T), que tiene en cuenta el resto de compuestos presentes en el

sistema como el amonio y el fosfato. De esta forma, valores de la relación ALK_I/ALK_T inferiores a 0.3 permiten mantener una adecuada capacidad tamponante en el sistema, mientras que valores por encima de 0.8 indican una inhibición de la población metanogénica y la acidificación del reactor (Lee and Day, 2013). Generalmente, valores de la alcalinidad entre 2000 y 2500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, aseguran un buen control del pH y una adecuada estabilidad del proceso (Zhao and Viraraghavan, 2004).

Dado que el pH afecta a los diferentes equilibrios químicos presentes en el sistema, influye directamente en la formación o disolución de precipitados así como en la disociación de compuestos (amonio, sulfuros). Por tanto, es una variable muy importante a tener en cuenta para minimizar la precipitación en digestores y la presencia de formas no ionizadas como el NH_3 o el H_2S , puesto que son tóxicas para la biomasa anaerobia.

Potencial de oxidación-reducción

El potencial oxidación-reducción, también conocido como potencial redox, es indicador de la presencia de aceptores de electrones en el medio como el O_2 , NO_3^- , NO_2^- , u otras fuentes. Las archaeas metanogénicas requieren ambientes fuertemente reductores, asegurándose una actividad de la biomasa anaerobia óptima con potenciales redox inferiores a los -300 mV, que garantizan las condiciones anaerobias en el reactor (Martí, 2007). Así mismo, la presencia de bacterias anaerobias facultativas o aerotolerantes elimina los posibles aceptores de electrones que se introduzcan en el sistema con el alimento, ayudando a mantener la estabilidad del proceso.

Tiempo de retención celular

El tiempo de retención celular (TRC) se define como el tiempo medio de permanencia de los microorganismos en el reactor. La biomasa anaerobia presenta velocidades de crecimiento muy inferiores a la biomasa aerobia, por lo que es

indispensable un TRC elevado para el correcto desarrollo de ésta y evitar el lavado del reactor. En un proceso convencional de digestión anaerobia de fangos se establecen TRCs comprendidos entre 15 y 20 días, mientras que si se desea alcanzar una digestión más completa y un fango totalmente estabilizado, el TRC se establece entre 20 y 30 días. Al aumentar el TRC, aumenta la proporción de materia orgánica degradada así como la producción de metano, la cual se estabiliza una vez alcanzado el óptimo.

El agua residual urbana tiene una baja carga orgánica, comparada con otras corrientes empleadas como sustratos para la digestión anaerobia. El tratamiento anaerobio de agua residual urbana a temperatura ambiente requiere elevados TRCs, siendo habitual encontrar valores de TRC en torno a los 60 días o incluso superiores (Giménez et al., 2011; Jeison and van Lier, 2007). En este caso, el uso de una configuración de reactor convencional como el reactor continuo de tanque agitado (CSTR), daría lugar a volúmenes de trabajo muy elevados. Consecuentemente, es necesario seleccionar una tecnología que permita trabajar a elevados TRC, bajos tiempos de retención hidráulicos y con reducidas necesidades de superficie, como son los biorreactores de membranas.

Tiempo de retención hidráulico y velocidad de carga orgánica

El tiempo de retención hidráulico (TRH) se define como el tiempo de permanencia de la corriente a tratar en el reactor. Este parámetro es de especial importancia en el diseño de reactores puesto que, para un caudal de tratamiento fijo, el TRH establecido determinará el volumen del reactor en aquellos sistemas que no estén provistos de un sistema de retención de la biomasa, que permita independizar el TRC y el TRH. Cuando la corriente a tratar presenta una elevada resistencia a la biodegradación anaerobia, se requieren elevados tiempos de residencia. Por ello, utilizar configuraciones de reactor que permitan desacoplar el TRH y el TRC recibe un papel relevante en la maximización de la degradación de la materia orgánica y la reducción del volumen del reactor. La velocidad de carga orgánica (OLR – *Organic*

Loading Rate) es la cantidad de materia orgánica introducida diariamente en el reactor por unidad de volumen, siendo este parámetro fijado por la concentración de sustrato y el tiempo de retención hidráulico. En ausencia de inhibidores, un incremento de la OLR da lugar a una mayor producción de metano hasta alcanzar un máximo. Sin embargo, un exceso de OLR en el proceso podría implicar una acumulación de ácidos grasos volátiles sin consumir en el sistema, debido a la mayor tasa de crecimiento de las bacterias acidogénicas frente a la biomasa metanógena, provocando el consiguiente descenso de pH en el reactor y la inhibición del proceso biológico.

Características del sustrato

La metabolización de la materia orgánica por parte de la biomasa anaerobia depende en gran medida de su composición y biodegradabilidad. La *biodegradabilidad* anaerobia es una propiedad intrínseca del sustrato, que indica la fracción del mismo que puede ser degradada mediante la acción de microorganismos en condiciones anaerobias. Esta biodegradación de compuestos orgánicos se ve influenciada por factores como su composición y concentración, su bioaccesibilidad y su biodisponibilidad (Hagos et al., 2016). Debido a la compleja estructura de la materia orgánica, la *bioaccesibilidad* se define como el grado de acceso que muestra la matriz compleja de materia orgánica a los microorganismos, representando la máxima cantidad de sustrato que puede ser degradado, mientras que la *biodisponibilidad* representa la fracción de sustrato que los microorganismos son capaces de hidrolizar en función de su metabolismo, siendo ambos parámetros dependientes del tiempo de retención, la actividad hidrolítica y el pretratamiento aplicado al material orgánico. Dado que la hidrólisis es la etapa limitante en la degradación anaerobia de sustratos complejos, dicha etapa es la responsable de la biodegradabilidad y la velocidad de degradación, siendo estos factores generalmente caracterizados mediante ensayos en discontinuo del potencial de biometanización (BMP – *Biochemical Methane Potential*) (Hagos et al., 2016).

En cuanto a la composición del sustrato, los microorganismos anaerobios son capaces de metabolizar distintos compuestos orgánicos como carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo, sustratos con un elevado contenido en proteínas y/o lípidos pueden afectar a la eficiencia del proceso anaerobio. La descomposición anaerobia de proteínas genera nitrógeno amoniacal como producto final, el cual puede dar lugar a la inhibición del proceso cuando se alcanzan elevadas concentraciones en el reactor. Sin embargo, esta inhibición puede evitarse reduciendo la concentración de sustrato en la corriente influente o incrementando la relación C/N mediante una co-digestión (Hagos et al., 2016). Así mismo, un sustrato con elevado contenido en lípidos también puede generar problemas durante su tratamiento anaerobio, debido a que su descomposición da lugar a ácidos grasos de cadena larga (LCFA – *Long Chain Fatty Acids*). Estos LCFA se adsorben sobre la superficie de la célula y producen la aglomeración de la biomasa, dificultando el mecanismo de transporte. De la misma forma que en el caso de las proteínas, una dilución de la corriente a tratar o una co-digestión con un co-sustrato de bajo contenido en lípidos puede evitar la inhibición del proceso (Kiran et al., 2016).

Agitación

Un factor fundamental para el correcto funcionamiento del proceso es la homogeneidad del reactor. Una agitación adecuada, minimiza la sedimentación y la estratificación, la formación de zonas muertas, mejora el contacto entre biomasa y sustrato, y evita la formación de gradientes en el sistema.

En los sistemas anaerobios, la agitación se realiza bien mediante la recirculación del propio fango o del biogás producido, o bien por agitación mecánica. La agitación por medio de la recirculación del propio biogás al sistema presenta ciertas ventajas, tales como: favorecer el contacto gas-líquido y, por tanto, los procesos de transferencia de compuestos entre ambas fases, favorecer la obtención de un pH estable de operación gracias al arrastre y extracción de los gases disueltos desde la

fase líquida, y minimiza la fricción que un sistema de agitación mecánica aporta al medio, reduciéndose así la rotura de los agregados formados.

Nutrientes

Los microorganismos anaerobios, al igual que cualquier organismo, necesitan macronutrientes (N y P) y micronutrientes (Fe, Ni, Mg, Ca, Na, Ba, Tu, Mo, Se y Co entre otros) para su crecimiento. Mientras que los macronutrientes son esenciales para la síntesis de material celular y el correcto funcionamiento del metabolismo microbiano, los micronutrientes tienen un papel crítico en la estabilidad del proceso. Aunque los metales son inhibitorios a elevadas concentraciones, a nivel de traza representan los componentes principales de la activación enzimática (Lee and Day, 2013). Una de las ventajas del proceso anaerobio es su baja necesidad de nutrientes, como consecuencia de la baja tasa de crecimiento de la biomasa anaerobia. Por ello, generalmente, las corrientes de aguas residuales urbanas contienen suficientes nutrientes para el correcto funcionamiento del proceso, y no requieren de la adición externa de éstos.

Tóxicos e inhibidores

Se denomina compuesto inhibidor a toda sustancia que provoca una disminución de la velocidad de un proceso determinado, así como la disminución de la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa. Si una sustancia inhibitoria alcanza concentraciones lo suficientemente elevadas como para producir una parada total del proceso o para provocar la muerte de los microorganismos asociados a éste, recibe el nombre de tóxico (Chen et al., 2008).

Los sistemas anaerobios presentan cierta sensibilidad a la inhibición del proceso en presencia de determinados compuestos. Estos compuestos, pueden formar parte del agua residual o ser generados por la propia actividad metabólica de los microorganismos. Entre los inhibidores de mayor importancia cabe destacar el

amoníaco, el ácido sulfhídrico, el descenso del pH por la presencia de ácidos grasos volátiles y los cationes y metales pesados.

Amonio/amoníaco

La presencia de amonio en el proceso anaerobio es beneficioso ya que, no solo sirve como nutriente sino que además mantiene la capacidad tamponante del sistema, siendo su concentración inocua para valores de alrededor de $200 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ (Sung and Liu, 2003). Sin embargo, elevadas concentraciones de amonio pueden inhibir el proceso, las cuales varían en función de la temperatura de operación y del pH del medio, ya que estos parámetros afectan a su constante de disociación dando lugar a la aparición de amoníaco en el reactor. A mayores temperaturas y valores de pH, mayor será la producción de amoníaco, el cual es un compuesto altamente inhibidor (de Lemos, 2007).

Los microorganismos metanógenos son los más sensibles al amoníaco, en especial los acetoclásticos, por lo que elevadas concentraciones de amoníaco se asocian con la perturbación del pH intracelular, la deficiencia de potasio y la inhibición de las reacciones enzimáticas, siendo responsables de bajas producciones de biogás y de la acumulación de ácidos en el sistema (Lee and Day, 2013).

Existen diversos estudios que reportan una amplia variedad de rangos de inhibición que abarcan desde $40 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ hasta $900 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (Appels et al., 2008; Belmonte et al., 2011; Buendía et al., 2009; Liu and Sung, 2002; Yenigün and Demirel, 2013), por lo que no hay un valor establecido para la inhibición de un proceso anaerobio. Esta inhibición dependerá de la exposición previa que haya sufrido la biomasa a esas concentraciones de amoníaco, ya que el proceso puede adaptarse a incrementos progresivos de este compuesto (Buendía et al., 2009), y a la condiciones operacionales que se establezcan en el reactor (Chen et al., 2008; Yenigün and Demirel, 2013).

Sulfhídrico

La presencia de sulfuros en los digestores anaerobios es debida principalmente a la reducción del sulfato por acción de las SRB, el cual puede provenir de la propia corriente influente y de la degradación de compuestos orgánicos que contienen azufre, como es el caso de las proteínas. Concentraciones de sulfuro de $200 \text{ mgS} \cdot \text{L}^{-1}$ causan una fuerte inhibición del proceso, y sobre $100 \text{ mgS} \cdot \text{L}^{-1}$ pueden comenzar a afectar a los microorganismos si no ha habido una aclimatación previa de la biomasa.

El sulfhídrico producido por las SRB es tóxico para microorganismos anaerobios como las archaeas metanogénicas, e incluso para las propias SRB en elevadas concentraciones (O'Flaherty et al., 1998). La actividad de la biomasa metanogénica es inhibida progresivamente, a medida que se incrementa la concentración de sulfhídrico debido a la desnaturalización de las proteínas, la interferencia con el metabolismo de la asimilación de azufre, y a la eliminación de metales en forma de sulfuros metálicos que da lugar a una deficiencia de micronutrientes en el medio (Lee and Day, 2013). Así mismo, tal y como se ha comentado anteriormente, en presencia de sulfatos las SRB compiten con las archaeas metanogénicas por los mismos sustratos. El resultado de esta competición determinará la proporción de sulfhídrico y metano en el biogás generado. A su vez, el incremento de los niveles de sulfhídrico en el biogás disminuye la calidad del mismo para su posterior uso como combustible, además de aumentar la aparición de problemas de olor y corrosión en el sistema (Lee and Day, 2013).

Ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles son la principal especie intermedia en el proceso anaerobio, y su acumulación en el sistema denota el desequilibrio del mismo. Como se ha explicado anteriormente, una acumulación de ácidos en el reactor puede provocar una caída del pH y, consecuentemente, la inhibición del proceso biológico. Sin embargo, las concentraciones que se consideran inhibitoras dependen de la

adaptación de la biomasa y de distintos factores del proceso, como la temperatura de operación y la capacidad tamponante.

Cationes y metales pesados

La presencia de cationes en el medio en concentraciones traza, estimula el crecimiento de los microorganismos anaerobios. Sin embargo, elevadas concentraciones de estos metales pueden inhibir el proceso. La toxicidad de los cationes se incrementa a media que se incrementa su peso molecular, de forma que los metales pesados provocan toxicidad a menores concentraciones. Las concentraciones a las que los metales se consideran tóxicos dependen de la adaptación de los microorganismos a la presencia de dichos metales, y de la presencia en el medio de otros compuestos que puedan reducir su efecto como es el caso de los sulfuros, ya que eliminarían los metales del medio mediante precipitación en forma de sulfuros metálicos.

1.3.3. Tecnologías para el tratamiento anaerobio

El desarrollo de las tecnologías para el tratamiento anaerobio dio lugar a que estos procesos alcanzaran eliminaciones de materia orgánica comparables a las de los sistemas aerobios, incrementándose su implementación a escala industrial. Mientras que la primera generación de reactores se caracterizó por mantener el TRH igual al TRC así como una deficiente homogenización del sistema, las sucesivas generaciones de reactores se han centrado en desarrollar configuraciones que permitan incrementar el TRC, manteniendo elevados caudales de tratamiento (Díaz-Báez et al., 2002).

Actualmente, los diseños utilizados para el tratamiento anaerobio pueden diferenciarse en función de su capacidad para mantener elevadas concentraciones de microorganismos en el reactor. Dado el lento crecimiento de la biomasa anaerobia, el empleo de elevados tiempos de retención celular promueve el desarrollo de microorganismos con baja tasa de crecimiento (Shin et al., 2011), así como la

hidrólisis de sustratos de difícil degradación. Consecuentemente, la adecuada selección de la configuración del biorreactor se ha convertido en un factor crítico para maximizar la producción de biogás dado que, para obtener un proceso anaerobio eficiente con un reducido volumen de trabajo, el diseño debe proporcionar un ambiente óptimo para el desarrollo de dichos microorganismos anaerobios (Kiran et al., 2016). Por ello, el principal objetivo de los diseños actuales es desacoplar el TRC del TRH y mantener un elevado ratio TRC/TRH, con el fin de minimizar el posible lavado de microorganismos del reactor, operar a elevadas velocidades de carga orgánica con un reducido volumen de trabajo y promover la biodiversidad microbiana (Khanal et al., 2017). Así pues, en la actualidad existen 4 estrategias para desacoplar ambos parámetros, las cuales se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Estrategias para mantener elevadas concentraciones de microorganismos en un proceso anaerobio (Adaptado de Khanal et al., 2017).

Estrategia	Mecanismo de retención de la biomasa	Tipo de reactor
Recirculación de la biomasa	Sustratos con un elevado contenido en sólidos permiten que los microorganismos se adhieran a ellos formando flóculos sedimentables, los cuales pueden ser recirculados al reactor tras un proceso de sedimentación.	CSTR
Formación de un fango granular	Los microorganismos se aglomeran en forma de gránulos que sedimentan en el reactor.	UASB ⁽¹⁾ Reactor de lecho granular estático Reactor discontinuo secuencial
Inmovilización de la biomasa en sistemas de cultivo fijo	Los microorganismos crecen adhiriéndose a un medio de soporte inerte, formando una biopelícula.	Filtro anaerobio Reactor rotativo de contacto Reactor de lecho fluidizado Reactor de lecho expandido
Retención de la biomasa	Un sistema de membranas permite retener la biomasa en el interior del reactor.	AnMBR ⁽²⁾

⁽¹⁾ *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (Reactor anaerobio de flujo ascendente)

⁽²⁾ *Anaerobic Membrane BioReactor* (Biorreactor anaerobio de membranas)

A continuación se describen las distintas configuraciones de reactor más utilizadas para el tratamiento anaerobio de la materia orgánica, desde las convencionales como el CSTR hasta las tecnologías más avanzadas y novedosas como el AnMBR.

1.3.3.1. Reactor agitado de mezcla completa (CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor*)

Este tipo de reactor mono-etapa es una de las tecnologías más comúnmente utilizadas para llevar a cabo la digestión anaerobia (Hagos et al., 2016), habiendo sido uno de los primeros diseños en desarrollarse. Consiste en un único reactor de tanque agitado, donde la homogenización se lleva a cabo bien mediante la recirculación de fango o del mismo biogás generado durante el proceso, o bien de forma mecánica, siendo la concentración de cualquier componente en el efluente igual a la del interior del reactor. En este tipo de configuración no se independiza el TRH del TRC, y su efluente requiere de un tratamiento posterior para separar el agua tratada y concentrar los sólidos presentes. Este tipo de reactor es apropiado para el tratamiento de corrientes concentradas, como pueden ser los efluentes industriales que contienen entre un 2% y un 8% en sólidos, siendo su mayor ventaja su simplicidad. Sin embargo, puesto que se operan a altos TRC, requieren de elevados volúmenes de trabajo.

1.3.3.2. Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

Esta generación de reactores surgió en los años 70 (Lettinga et al., 1980) dio paso a una tecnología en la que la separación del agua tratada se produce en el interior del reactor. El funcionamiento de este tipo de reactores de cultivo en suspensión consiste en introducir uniformemente el agua residual a tratar por la parte inferior del sistema, donde entra en contacto con un lecho de fango granular anaerobio. La producción de biogás como consecuencia de la degradación anaerobia de la materia orgánica junto

con la velocidad de ascensión del líquido, provoca la suspensión del lecho de fango e influye tanto en la agitación como en la formación y mantenimiento de los gránulos. Una vez el biogás es liberado, el fango vuelve a caer a la zona inferior del reactor, siendo dicho biogás recogido en las cámaras correspondientes, mientras que el agua residual tratada sale del reactor por rebose. El elemento donde se separan el biogás, el agua residual tratada y el fango se denomina separador trifásico.

El correcto funcionamiento de esta tecnología se basa en la formación y mantenimiento de un fango granular, caracterizado por su elevada sedimentabilidad y su alta actividad metanogénica (Hulshoff Pol et al., 2004), así como en el adecuado establecimiento del caudal de recirculación y, consecuentemente, del flujo ascensional del agua puesto que éste juega un papel importante en el contacto de la biomasa con el sustrato (Powar et al., 2013; Zheng et al., 2012). Los sistemas UASB son capaces de desacoplar el TRH del TRC, manteniendo un TRC muy elevado en comparación con el TRH, y pueden tratar elevadas cargas orgánicas, requiriendo un menor volumen de reacción y produciendo una gran cantidad de energía en forma de biogás.

1.3.3.3. Filtros anaerobios (USSB – *Upflow Static Sludge Bed*)

Este tipo de reactor de soporte fijo se compone de una columna, en cuyo interior se sitúa un material de relleno inerte. El agua a tratar se distribuye uniformemente por la base del reactor y sigue un flujo ascendente a través de la columna, entrando en contacto con el relleno sobre el que se desarrollan y fijan los microorganismos anaerobios en forma de biopelícula (Khanal et al., 2017; Young, 1991). Dado que una elevada cantidad de biomasa es retenida en el medio soporte y no es arrastrada por el efluente, se pueden obtener tiempos medios de retención celular muy elevados con bajos tiempos de retención hidráulicos. La aplicación de este sistema es adecuada para el tratamiento de corrientes con elevado contenido en compuestos orgánicos solubles de fácil degradación. Sin embargo, esta tecnología no es aplicable

a corrientes con elevado contenido en sólidos puesto que dan lugar a obstrucciones y a la aparición de caminos preferenciales (Jawed and Tare, 2000).

1.3.3.4. Biorreactor anaerobio de membrana (AnMBR – *Anaerobic Membrane BioReactor*)

A la hora de implementar un tratamiento anaerobio, el proceso de separación del agua tratada es uno de los aspectos que mayor dificultad presenta. Una solución avanzada para mejorar la eficiencia del tratamiento anaerobio es integrar, en un único sistema, un biorreactor anaerobio con un proceso de separación mediante filtración por membrana (AnMBR), de forma que se consigue desacoplar completamente el TRH del TRC. Este sistema permite separar el agua tratada a la vez que retiene la biomasa en el reactor, promoviendo microorganismos con una baja tasa de crecimiento, evitando por completo el lavado de microorganismos del reactor y reduciendo significativamente el volumen total requerido (Khanal et al., 2017).

Aunque la tecnología AnMBR se desarrolló en los años 80 (Grethlein, 1978), ésta se encontró limitada por los problemas asociados al *fouling* y al elevado consumo energético de los procesos de membrana. Sin embargo, el desarrollo de membranas más eficientes, de menor coste y mayor vida útil, así como el desarrollo de nuevos diseños y estrategias de operación, dio lugar al avance de una tecnología cada vez más eficiente cuyo mayor inconveniente es el coste de inversión inicial. Las ventajas que presentan actualmente las membranas anaerobias, las cuales se muestran en la Tabla 1.4, convierten al AnMBR en una de las tecnologías más prometedoras, capaz de desplazar a los sistemas de tratamiento convencionales. Entre estas ventajas cabe destacar la posibilidad de operar el reactor a elevados TRC en una superficie de trabajo reducida, y la obtención de un efluente de elevada calidad. Esta calidad se obtiene al implementar en el reactor una membrana de ultrafiltración, la cual da lugar a un permeado libre de sólidos y patógenos, y con una baja concentración de materia orgánica soluble. Aunque este efluente presente elevadas concentraciones de

nutrientes, así como la posible presencia de sulfuros y metano disuelto (Giménez et al., 2012; Khan et al., 2011), su elevada calidad facilita su post-tratamiento ya que esta corriente puede ser reutilizada como fertilizante o para la recuperación de nutrientes como subproducto.

Tabla 1.4. Comparación del tratamiento aerobio y anaerobio convencional con la tecnología AnMBR (Adaptado de Lin et al., 2013).

Características	Tratamiento aerobio convencional	Tratamiento anaerobio convencional	AnMBR
Eficiencia de eliminación orgánica	Alta	Alta	Alta
Calidad del efluente	Alta	Moderada/baja	Alta
Velocidad de carga orgánica	Moderada	Alta	Alta
Producción de fangos	Alta	Baja	Baja
Huella de carbono	Alta	Alta/Moderada	Baja
Retención de biomasa	Baja/Moderada	Baja	Total
Necesidad de nutrientes	Alta	Baja	Baja
Necesidades energéticas	Alta	Baja	Baja
Sensibilidad a la temperatura	Baja	Baja/Moderada	Baja/Moderada
Recuperación energética	No	Si	Si

El considerable avance de la tecnología de membranas ha suscitado el interés de la comunidad científica. Por ello, se han llevado a cabo numerosos estudios para el tratamiento de diferentes corrientes residuales tanto a escala de laboratorio (Jeison and van Lier, 2007; Lew et al., 2009) como a escala de planta piloto (Giménez et al., 2011; Moñino et al., 2017), en los cuales se demostró su viabilidad económica (Pretel et al., 2016b).

Uno de los factores más importantes en la implementación de un AnMBR es la adecuada selección de la membrana, así como la disposición de ésta en el sistema anaerobio. Las membranas de uso más extendido son las de lámina plana, las de fibra

hueca o las tubulares, siendo los diámetro de poro más habituales aquellos que las clasifican como membranas de microfiltración o de ultrafiltración (Skouteris et al., 2012). Así mismo, se han definido distintas configuraciones de reactor en función de la forma de integración de estas membranas en el sistema anaerobio, tal y como se muestra en la Figura 1.9.

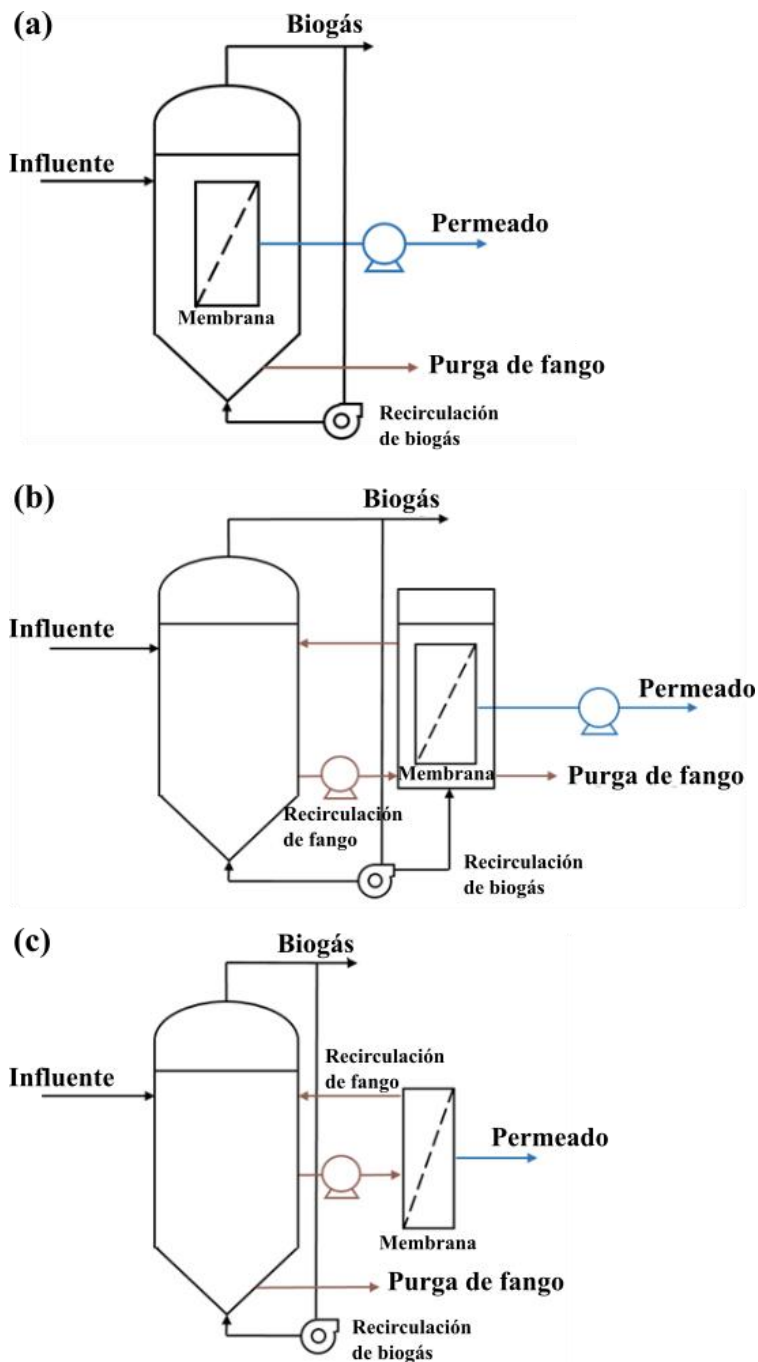


Figura 1.9. Configuraciones de un AnMBR: (a) membrana interna sumergida, (b) membrana externa sumergida (c) membrana externa de flujo tangencial (Adaptado de Chang, 2014).

En la configuración de membranas sumergidas, la membrana puede estar directamente inmersa en el reactor (Figura 1.9a) o en un tanque externo conectado al reactor anaerobio y con una continua recirculación del fango entre ambas unidades (Figura 1.9b). En los dos casos, el biogás generado es inyectado bajo las membranas con el fin de que el burbujeo reduzca la acumulación de fango y el fouling, obteniéndose el permeado mediante un gradiente de presión generado por la presión hidrostática y/o por succión mediante una bomba. La mayor diferencia entre ambas configuraciones se basa en su facilidad de operación, ya que con las membranas sumergidas externas se pueden realizar las operaciones de mantenimiento, reparación o sustitución de la membrana sin necesidad de detener el proceso biológico ni afectar a la operación del reactor.

En la configuración de flujo tangencial (Figura 1.9c), la membrana se encuentra conectada en un sistema externo donde la filtración se lleva a cabo aplicando un elevado flujo tangencial y/o mediante bombeo. La separación por flujo tangencial suele ir asociada a elevadas velocidades de flujo a través de las membranas, así como a elevadas presiones transmembrana (PTM). Estas velocidades de flujo se consiguen con elevados caudales de circulación del fango sobre la superficie de las membranas, reduciéndose así la acumulación de sólidos. Sin embargo, estos elevados caudales incrementan considerablemente el consumo energético asociado al proceso de filtración en comparación con la configuración de membranas sumergidas.

1.4. Post-tratamiento de efluentes de procesos anaerobios

Los efluentes de tratamientos anaerobios convencionales suelen caracterizarse por contener una concentración remanente de materia orgánica y sólidos suspendidos, así como presencia de patógenos y elevadas concentraciones de nutrientes. Por ello, requieren de un post-tratamiento antes de ser vertidos al medio receptor (Khan et al., 2011), el cual dependerá tanto de la tecnología empleada para llevar a cabo el proceso anaerobio como de la eficiencia del mismo, ya que ambos factores

determinan la calidad del efluente. No obstante, actualmente, la selección del post-tratamiento no se basa solo en las características de la corriente a tratar, sino también en utilizar una tecnología sostenible que permita la valorización del agua residual. Así pues, el post-tratamiento más adecuado debe ser capaz de depurar la corriente anaerobia mediante una tecnología sencilla y que permita la recuperación de recursos tales como el agua y los nutrientes.

1.4.1. Post-tratamientos convencionales

Los post-tratamientos convencionales se basan en la eliminación de los contaminantes mediante la aplicación de procesos biológicos o químicos que no contemplan la recuperación o reutilización de recursos. En el caso del efluente de una digestión anaerobia convencional en una EDAR, el tratamiento biológico más habitual para eliminar materia orgánica, nitrógeno y fósforo, consiste en recircular esta corriente a la entrada de la EDAR para tratarla conjuntamente con el agua residual influente mediante un esquema de tratamiento denominado A_2O (anaerobio-anóxico-óxico), el cual se basa en combinar una etapa anaerobia y otra etapa anóxica con un proceso biológico convencional de fangos activados (Foresti et al., 2006). En el caso de llevar a cabo el tratamiento anaerobio de aguas residuales empleando una configuración de reactor más avanzadas como el AnMBR, debe implementarse un post-tratamiento para eliminar los nutrientes y el elevado porcentaje de metano disuelto. Recientes estudios han demostrado que el post-tratamiento de este tipo de efluente puede llevarse a cabo mediante un proceso de fangos activados con una configuración UCT (*University of Cape Town*), en el que se emplean ácidos grasos volátiles, sulfuros y metano disuelto como dadores de electrones (Sánchez-Ramírez et al., 2015). Sin embargo, en los dos casos presentados el nitrógeno es eliminado en forma de N_2 , liberándolo a la atmósfera, y el fósforo es almacenado intracelularmente por los microorganismos de forma que solo podría ser reutilizado si el fango generado es apto para su aplicación agrícola, por lo que se hace imposible la recuperación de ambos nutrientes. Además, estos post-tratamientos convencionales

incrementan la superficie requerida y los costes energéticos asociados al suministro de oxígeno en la fase aerobia (Åkerström et al., 2014), y requieren de un tratamiento terciario que elimine los patógenos presentes, lo que mantiene a estos procesos lejos de la sostenibilidad y del objetivo de maximizar la recuperación de recursos.

El proceso de precipitación química es otra de las técnicas más extendidas en las EDAR para la eliminación de fósforo, el cual se lleva a cabo mediante la dosificación de sales metálicas, normalmente de hierro o aluminio. Este tratamiento no hace posible la recuperación del fósforo ni la reutilización del fango generado para la agricultura, ya que el aluminio es tóxico para muchos cultivos y microorganismos presentes en el suelo, y el hierro solo es asimilado por las plantas en una pequeña fracción. A su vez, la precipitación química de fósforo incrementa los costes del proceso de depuración tanto por la utilización de reactivos como por el tratamiento y disposición de fango contaminado por metales.

Por todo ello, se hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos a los convencionales que ofrezcan resultados similares pero con un coste reducido y una mayor sostenibilidad.

1.4.2. Microalgas para el tratamiento de aguas residuales

Una alternativa sostenible que permite maximizar la recuperación de recursos es emplear un cultivo de microalgas como post-tratamiento avanzado de corrientes residuales, debido a la capacidad fotosintética de estos organismos que les permite utilizar la energía de la luz solar para sintetizar materia orgánica, a partir de nutrientes y una fuente inorgánica de carbono. El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales fue inicialmente propuesto por Oswald et al. (1957), pero es en las últimas décadas cuando ha ganado relevancia debido a su potencial de eliminar nitrógeno y fósforo del agua residual, reducir las emisiones de CO₂ y producir una biomasa aprovechable (Bharathiraja et al., 2015; Rawat et al., 2011),

mediante una tecnología sencilla y que permite alcanzar eficiencias de eliminación de organismos patógenos superiores al 99% (Gupta et al., 2016).

El cultivo de microalgas puede aplicarse en distintas etapas del ciclo de tratamiento de aguas, bien como tratamiento terciario para evitar problemas de eutrofización en el medio receptor, o tras la etapa de digestión anaerobia (Hidaka et al., 2014). El efluente de una digestión anaerobia presenta elevadas concentraciones de amonio y fosfato, nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, lo que convierte a esta corriente en una de las más adecuadas para el cultivo de biomasa algal. Sin embargo, como se ha comentado con anterioridad, los sistemas convencionales para llevar a cabo la digestión anaerobia, generan un efluente con elevada concentración de sólidos que podría interferir en el crecimiento de las microalgas, ya que la turbidez reduciría la penetración de la luz solar (Uggetti et al., 2014). No obstante, el avance de las tecnologías para el tratamiento anaerobio de aguas residuales, detallado en el apartado 1.3.3, ha dado lugar a que el efluente obtenido tras el proceso anaerobio presente calidades muy variables, en función de la configuración de reactor seleccionada. Así pues, desde el punto de vista de la maximización de la recuperación de energía y recursos del agua residual, la combinación del tratamiento anaerobio mediante la tecnología AnMBR con un post-tratamiento basado en el cultivo de microalgas se presenta actualmente como una de las opciones más prometedoras a nivel económico y medioambiental, siendo este esquema de tratamiento considerado como una alternativa a los procesos A_2O convencionales.

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de distintas especies de microalgas para conseguir elevados rendimientos de eliminación de los nutrientes presentes en el agua residual urbana (Cai et al., 2013; Li et al., 2011; Manninen et al., 2016). Concretamente, Ruiz-Martinez et al. (2012) demostraron a escala de laboratorio que el cultivo de microalgas puede ser utilizado como post-tratamiento del efluente de un AnMBR, en el que se lleva a cabo el tratamiento anaerobio de agua residual urbana, alcanzando un elevado rendimiento de eliminación de amonio (67.2%) y

fosfato (97.8%). Posteriormente, Viruela et al. (2016) demostraron la viabilidad del escalado de este post-tratamiento en una planta piloto constituida por fotobiorreactores de placa plana, de 0.55 m³ cada uno, siendo capaces de obtener un efluente que cumple los límites de vertido de nutrientes establecidos por la Directiva Europea 91/271/CEE para zonas sensibles y un tamaño de población de entre 10000 y 100000 habitantes equivalentes. Puesto que la configuración AnMBR ha sido considerada como una prometedora tecnología para la valorización en forma de biogás de la materia orgánica presente en el agua residual y la recuperación de recursos hídricos (Giménez et al., 2011; Lin et al., 2013; Moñino et al., 2017), su acoplamiento a un sistema de cultivo de biomasa algal contribuye al ya nombrando cambio de paradigma de las aguas residuales, desde el concepto clásico de tratamiento hacia el nuevo concepto de recuperación de recursos. Este sistema integrado presenta numerosas ventajas como son la generación de energía en forma de biogás, la reducción de los costes de tratamiento del agua residual y de las emisiones de gases de efecto invernadero, la obtención de un recurso hídrico susceptible de reutilización y la producción económica de una biomasa algal que permite la recuperación de nutrientes en forma de productos comerciales, así como su valorización en forma de productos de valor añadido para aplicaciones industriales o para la producción de biocombustibles (Safi et al., 2014).

Tradicionalmente, la aparición de biomasa algal se consideraba un problema debido a que se incrementaba la materia orgánica en el proceso a partir de compuestos inorgánicos, es decir, ya mineralizados. Sin embargo, los numerosos usos que actualmente tiene la biomasa suponen una mejora en el balance económico y medioambiental del proceso. Concretamente, el uso de biomasa algal para la producción de biocombustibles ha sido objeto de estudio a nivel mundial, debido a su carácter renovable, a su elevado potencial de valorización energética y a los beneficios que supone frente al uso de combustibles fósiles.

Biotecnológicamente, la biomasa como recurso puede ser considerada como materia orgánica en la que la energía es almacenada en forma de enlaces químicos. La ruptura de dichos enlaces entre las moléculas adyacentes de carbono, hidrógeno y oxígeno por procesos de digestión, combustión o descomposición, da lugar a la liberación de esta energía química almacenada (McKendry, 2002). Paradójicamente, antes del desarrollo y la casi total dependencia de los combustibles fósiles, la conversión de la biomasa abasteció a la humanidad de calor, iluminación y energía durante siglos. Actualmente, la biomasa contribuye entre un 8% y un 15% al suministro energético mundial en forma de calor, electricidad y combustible para el transporte, y se estima que entre el 33% y el 50% de la energía primaria mundial podría llegar a ser suministrada por biomasa en el año 2050 (Vassilev and Vassileva, 2016).

La conversión de biomasa en energía puede llevarse a cabo a través de la combustión directa, de procesos de transformación termoquímicos y de procesos biológicos, dando lugar a biocombustibles sólidos, líquidos y gaseosos, tal y como se muestra en la Figura 1.10. Estos biocombustibles se clasifican en primera, segunda y tercera generación, en función del origen de la biomasa empleada para su obtención.

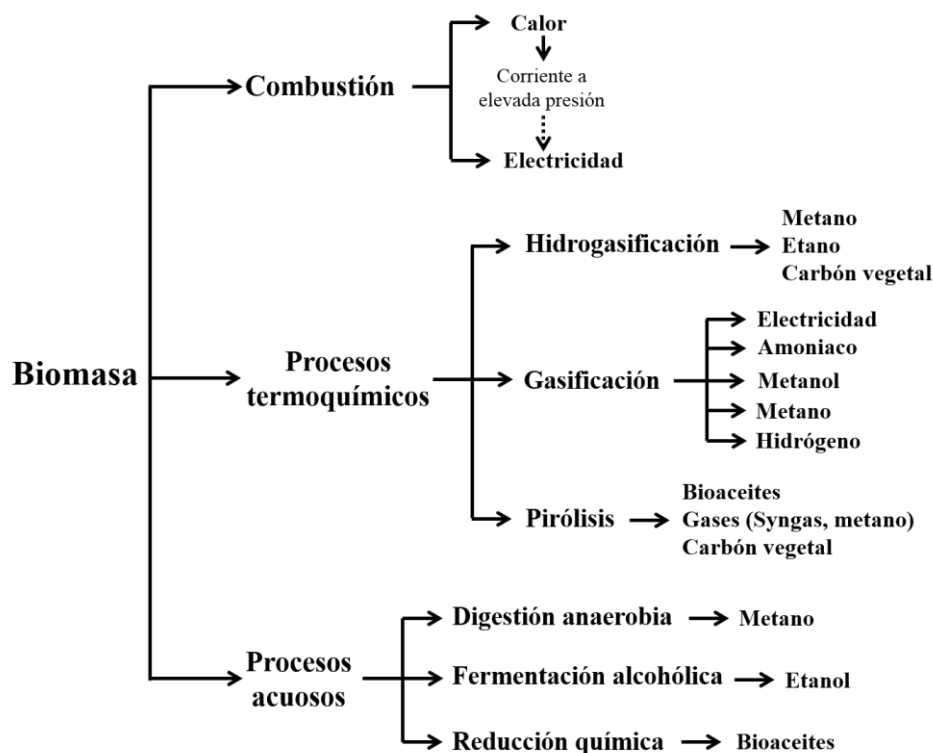


Figura 1.10. Procesos de conversión energética de la biomasa (Adaptado de Lee and Day, 2013; Qureshi et al., 2013).

Así pues, las microalgas han sido ampliamente reconocidas como la materia prima de la denominada tercera generación de biocombustibles, capaces de solventar los problemas asociados a la biomasa empleada en la primera y segunda generación de biocombustibles (Tijani et al., 2015).

Los **biocombustibles de primera generación** son aquellos que derivan de azúcar, almidón y aceites, extraídos por técnicas convencionales a partir de materias primas involucradas en la cadena alimenticia humana o animal como maíz, caña de azúcar, remolacha, girasoles, colza, trigo, cebada, soja, patatas, aceite de palma y grasas animales entre otras. Esta primera generación de biocombustibles se caracteriza tanto por su aptitud para ser mezclados con combustibles fósiles, reduciendo las emisiones de CO₂, como por poder emplearse como biocombustible para el transporte. Hoy en

día, casi 50 billones de litros de estos biocombustibles son producidos anualmente, siendo los principales tipos de biocombustibles de primera generación comercializados el biodiesel, el bioetanol y el biogás (Vassilev and Vassileva, 2016). Estos biocombustibles presentan como ventaja que la biomasa utilizada para su producción proviene de cultivos ya establecidos y prácticamente disponibles en todo el mundo, siendo su transformación llevada a cabo mediante una sencilla tecnología ya existente. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes que los limitan como alternativa a los combustibles fósiles. En primer lugar, estos combustibles se producen principalmente de cultivos destinados a la alimentación humana o animal, compitiendo directamente con la producción de alimentos y, por tanto, afectando al mercado, precio y seguridad alimenticia global (Vassilev and Vassileva, 2016). Esto da lugar a un conflicto ético que plantea el dilema entre cosechar para producir alimentos o combustibles, dado que para la sustitución completa de los combustibles fósiles habría que destinar toda la superficie cultivable a su producción, lo que los convierte en insostenibles. Así mismo, hacen un uso intensivo del suelo, deteriorándolo, y requieren grandes cantidades de agua y fertilizantes para su cultivo. Puesto que el continuo desarrollo de la humanidad da lugar a un incremento de la demanda energética, se necesitaría destinar mayores superficies a cultivos energéticos intensivos, lo que también supondría una amenaza para la biodiversidad del planeta.

La ***segunda generación de biocombustibles*** se desarrolló para superar el principal problema de los biocombustibles de primera generación, diferenciándose de éstos en que la biomasa utilizada no proviene de cultivos destinados a la alimentación en primera instancia. La biomasa empleada para generar biocombustibles de segunda generación es principalmente materia lignocelulósica que engloba todo tipo de residuo forestal o agrario, residuo industrial y desechos orgánicos como madera, restos de poda, residuos sólidos urbanos o fango procedente del tratamiento de aguas residuales. Los biocombustibles de segunda generación presentan más ventajas que

los de primera generación ya que no compiten con la producción de alimentos y, normalmente, tienen mayores rendimientos y menores necesidades de superficie, pudiendo utilizar terrenos marginales para su cultivo que no son aptos para la producción de alimentos. Sin embargo, estos biocombustibles presentan una gran desventaja puesto que requieren de tecnologías específicas para llevar a cabo los procesos de conversión termoquímica (gasificación, pirólisis o torrefactado) y de conversión bioquímica (Figura 1.10). La complejidad de estas tecnologías y su todavía baja eficiencia, incrementan el coste de producción que, en muchos casos, resulta económicamente inviable en comparación con el uso de combustibles fósiles. Por lo tanto, su implantación a escala comercial requiere del desarrollo y optimización de las tecnologías para obtener estos biocombustibles.

La problemática asociada a la primera y segunda generación de biocombustibles dio lugar a la **tercera generación de biocombustibles**, basada en el uso de microalgas. El uso de microalgas para producir biocombustibles presenta numerosas ventajas en comparación con las materias primas empleadas en los biocombustibles de primera y segunda generación. Las microalgas presentan una elevada eficiencia fotosintética y una velocidad de crecimiento de entre 20 y 30 veces superior a la biomasa procedente de cultivos energéticos, así como un elevado rendimiento por unidad de superficie (Schenk et al., 2008). Según la especie, pueden contener hasta el 60% de su peso en forma de lípidos y carbohidratos, un porcentaje muy superior al resto de materias primas lignocelulósicas que les confiere la capacidad de proporcionar hasta 30 veces más biocombustible que los cultivos terrestres (Ullah et al., 2015). Otra de las ventajas de la biomasa algal es que puede ser utilizada como estrategia para reducir las emisiones de CO₂, gracias a su gran capacidad para convertir este gas de efecto invernadero en materia orgánica. Así mismo, puede ser cultivada en casi cualquier lugar, tanto en agua dulce como salada, sin necesidad de aplicar pesticidas y no requieren de terrenos arables, por lo que no compite con la producción de alimentos. Su gran capacidad de adaptación hace que su cultivo pueda realizarse bajo

diferentes condiciones ambientales e incluso en terrenos marginales o aguas residuales, ayudando a prevenir posibles problemas de eutrofización (Vassilev and Vassileva, 2016).

Las características de los lípidos que acumulan las microalgas las hacen adecuadas para la producción termoquímica de biocombustible, ya que presentan un alto nivel de saturación. La transformación de estos lípidos en biodiesel se realiza comúnmente mediante la extracción y transesterificación de los triglicéridos, siendo éste el mismo proceso que se lleva a cabo en los materiales lignocelulósicos terrestres. El biodiesel obtenido presenta una elevada calidad y estabilidad, lo que permite almacenarlo durante largos periodos de tiempo. Así mismo, el bioaceite puede ser utilizado como sustitutivo directo del diésel convencional dadas sus similares propiedades, aunque requeriría la modificación de los motores actuales, o como aditivo en el diésel para reducir las emisiones de gases (Rawat et al., 2013). Sin embargo, los procesos de producción de biodiesel a gran escala requieren de tecnología compleja y energéticamente costosa, por lo que el desarrollo y optimización de los procesos es un factor clave para su implantación a escala industrial ya que solo es viable cuando el contenido en lípidos de las microalgas es superior al 40% (Sialve et al., 2009). Con el fin de reducir estos costes, la biomasa residual del proceso de extracción puede revalorizarse energéticamente en forma de metano, bioetanol o hidrógeno, o dar lugar a subproductos de alto valor añadido.

A pesar de que la biomasa algal parece ser la única fuente de energía renovable capaz de suplir la demanda global de combustibles a largo plazo, siendo reconocida como la respuesta más sostenible, eficiente y respetuosa con el medio ambiente para el cambio climático y la seguridad alimenticia (Schenk et al., 2008; Ullah et al., 2015; Vassilev and Vassileva, 2016; Ward et al., 2014), deben optimizarse ciertos factores tecno-económicos para hacer competitivo el proceso a escala industrial. Entre estos factores cabe destacar (I) la selección de la especie de microalga a cultivar, puesto que el proceso será más rentable cuanto mayor capacidad de acumulación de lípidos

tenga la biomasa algal, (II) el uso de una fuente de nutrientes de bajo coste para su cultivo como el agua residual, ya que puede reducir los costes del cultivo hasta en un 20% (Xin et al., 2016), (III) la optimización del sistema de cosechado y (IV) el desarrollo y optimización de técnicas que simplifiquen el proceso y lo hagan económicamente viable (Carneiro et al., 2017; Manninen et al., 2016; Vassilev and Vassileva, 2016).

Los procesos biológicos presentan una posible alternativa económica para la producción de biocombustibles a partir de microalgas (Figura 1.10), aunque la tecnología no está todavía tan desarrollada como la empleada en la obtención de biodiesel. El butanol y el etanol pueden producirse a través de un proceso de fermentación alcohólica mediante la acción de enzimas fermentativas. El etanol se emplea como aditivo de los combustibles fósiles con el fin de reducir las emisiones, mientras que el butanol contiene una densidad energética similar a la de la gasolina y puede emplearse como sustitutivo de ésta sin necesidad de realizar modificación en los motores actuales. A pesar de que la fermentación alcohólica requiere de pretratamientos para hidrolizar la biomasa, este proceso puede acoplarse a la producción de biodiesel. El residuo algal generado tras la conversión de biomasa a biodiesel, puede ser utilizado como materia prima para la fermentación alcohólica. De esta forma, se evita el uso de pretratamientos y se puede compensar los costes energéticos asociados a la producción de biodiesel.

Así mismo, otro proceso biológico que puede reducir los costes de la producción de biodiesel, haciendo uso de la biomasa algal residual, es la digestión anaerobia. Este proceso biológico suele tener un bajo rendimiento dada la resistencia a la degradación biológica que exhiben los materiales lignocelulósicos. Puesto que el residuo algal de la producción de biodiesel ya viene parcialmente degradado, el rendimiento de su tratamiento anaerobio se ve incrementado. Consecuentemente, dado que el metano presenta un alto rendimiento energético y es actualmente considerado como la energía renovable por excelencia, así como una posible fuente

de energía primaria (Tijani et al., 2015), la comunidad científica está centrando sus esfuerzos en maximizar su producción a través de la digestión anaerobia. Los procesos anaerobios emplean tecnologías sencillas, sin elevados consumos energéticos y que generan como subproducto un digestato, con alto contenido en nutrientes, que puede emplearse como biofertilizante.

A su vez, con el fin de incrementar el rendimiento de los distintos procesos de generación de biocombustibles, se están llevando a cabo diversos estudios basados en la modificación genética de las microalgas para incrementar su velocidad de crecimiento, su capacidad de acumular lípidos o reducir su resistencia a la biodegradación cambiando los niveles de lignina y la estructura de la hemicelulosa (Unkefer et al., 2016). Así pues, los organismos modificados genéticamente están dando paso a la denominada *cuarta generación de biocombustibles*.

1.5. Digestión anaerobia de microalgas

La digestión anaerobia de microalgas fue estudiada por primera vez por Golueke et al. (1957) pero a partir de los años 80, este proceso fue relegado a un segundo plano por el uso de procesos termoquímicos para la producción de biocombustibles líquidos, principalmente biodiesel. Actualmente, la costosa tecnología para la obtención de biodiesel ha convertido a la digestión anaerobia en un prometedor proceso que está siendo objeto de estudio a nivel mundial (Klassen et al., 2016; Molinuevo-Salces et al., 2016; Montingelli et al., 2015; Perazzoli et al., 2016), ya que es capaz de valorizar la biomasa algal en forma de biogás mediante una tecnología sencilla y sin elevados consumos energéticos. Este proceso puede aplicarse para la producción de biocombustible a partir de microalgas mediante tres vías: (i) directamente tras su cultivo y concentración, (ii) tras un pretratamiento que logre la disrupción celular de las microalgas e incremente así su biodegradabilidad anaerobia y (iii) combinada con la producción de biodiesel, utilizando el residuo algal generado tras el proceso de extracción de lípidos para mejorar el balance

energético global (Dong et al., 2016; Sialve et al., 2009; Vassilev and Vassileva, 2016).

Dada la importancia del contenido de lípidos de la biomasa algal en la eficiencia y minimización de los costes de producción de biodiesel, Sialve et al. (2009) afirman que siempre que el contenido en lípidos de la biomasa algal sea inferior al 40 % de su peso seco, resulta energéticamente más favorable la digestión anaerobia directa de microalgas que el proceso de producción de biodiesel. Sin embargo, el contenido en materiales recalcitrantes que presentan ciertas especies de microalgas en su estructura, tales como la hemicelulosa, dificultan su biodegradabilidad anaerobia limitando la producción de biogás. Así pues, la optimización biotecnológica de la digestión anaerobia es un factor clave para maximizar la eficiencia del proceso y, por tanto, la valorización energética de la microalgas en forma de biogás. Entre los factores clave a optimizar se encuentran el sistema de concentración de la biomasa algal, ya que una biomasa algal muy diluida da lugar a una baja eficiencia del proceso biológico y puede incluso dar lugar al lavado del digestor, el uso de una fuente de nutrientes económica como el agua residual y la transformación del sustrato en el máximo volumen de metano posible (Ward et al., 2014).

1.5.1. Especies de microalgas

La digestión anaerobia de biomasa algal ha sido evaluada con numerosas especies de microalgas, tanto marinas como de agua dulce, con el fin de encontrar la especie que presente un mayor potencial de biometanización, y haga así viable económicamente la producción de biogás.

En la Tabla 1.5 se muestra un resumen bibliográfico del metano producido a partir de la degradación anaerobia de diferentes microalgas. Cabe destacar que para evaluar los distintos valores proporcionados en esta tabla, así como para realizar su comparación con futuros estudios, es necesario conocer la producción de metano teórica. Esta producción teórica de metano, para aquellos resultados expresados en

términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO), tiene un valor de $350 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$ a 0°C de temperatura y presión atmosférica (cálculo detallado en el apartado 3.2). Para los datos presentados en la Tabla 1.5 en términos de Sólidos Volátiles (SV), la producción teórica de metano es de $549 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$, siendo este valor estimado en base a una composición media de la biomasa algal de 50% en proteínas, 23% en carbohidratos y 18% en lípidos (Klassen et al., 2016).

Tabla 1.5. Producción de metano mediante la digestión anaerobia de distintas especies de microalgas.

Microalga	Producción de metano	Reactor	Temperatura de operación	Referencia
<i>Acutodesmu obliquus</i> (58%), <i>Occystis</i> (36%), <i>Phormidium</i> (1%), <i>Nitzschia</i> (5%)	$188 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Alzate et al. (2012)
<i>Acutodesmus obliquus</i>	$229 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$; $137 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Gruber-Brunhumer et al. (2016)
<i>Arthrospira maxima</i>	$90 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	CSTR	Mesófilo	Inglesby and Fisher (2012)
<i>Arthrospira maxima</i>	$136 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	AAR ⁽¹⁾	Mesófilo	Inglesby and Fisher (2012)
<i>Arthrospira maxima</i>	$173 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	ADMCF ⁽²⁾	Mesófilo	Inglesby and Fisher (2012)
<i>Arthrospira platensis</i>	$293 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Mussnug et al. (2010)
<i>Chlamydomonas</i> (40%), <i>Scenedesmus</i> (20%), <i>Nannocloropsis</i> (40%)	$395 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Alzate et al. (2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	$387 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Mussnug et al. (2010)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	$263 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Mahdy et al. (2014)
<i>Chlorella emersonii</i>	$228 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1}$; $136 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$	Batch	Mesófilo	Gruber-Brunhumer et al. (2016)

Tabla 1.5 (Continuación I). Producción de metano mediante la digestión anaerobia de distintas especies de microalgas.

Microalga	Producción de metano	Reactor	Temperatura de operación	Referencia
<i>Chlorella kessleri</i>	218 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Mussgnug et al. (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	191 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹	Batch	Mesófilo	Mahdy et al. (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i> (211/11B)	147-240 mLCH ₄ ·gVSS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Ras et al. (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i> (ESP-6)	318 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Termófilo	Lü et al. (2013)
<i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	100-140 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Yen and Brune (2007)
<i>Euglena gracilis</i>	325 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Mussgnug et al. (2010)
<i>Gracilaria</i>	293 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Azizi et al. (2016)
<i>Gracilaria</i>	236 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Termófilo	Azizi et al. (2016)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	ASBR ⁽³⁾	Termófilo	Aydin (2016)
<i>Isochrysis galsana</i>	338 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Caporgno et al. (2015b)
<i>Isochrysis galsana</i>	219 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Termófilo	Caporgno et al. (2015b)
<i>Monoraphidium</i> sp., <i>Stigeoclonium</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp.	120-130 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Passos et al. (2014a)
<i>Pediastrum</i> , <i>Micractinium</i> , <i>Scenedesmus</i>	225 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	AVR ⁽⁴⁾	Mesófilo	Kinnunen et al. (2014)
<i>Pediastrum</i> , <i>Micractinium</i> , <i>Scenedesmus</i>	180 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Kinnunen et al. (2014)

Tabla 1.5 (Continuación II). Producción de metano mediante la digestión anaerobia de distintas especies de microalgas.

Microalga	Producción de metano	Reactor	Temperatura de operación	Referencia
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	168 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	AnMBR	Mesófilo	Zamalloa et al. (2012b)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	178 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Mussnug et al. (2010)
<i>Scenedesmus</i> sp.	33 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹	CSTR	Mesófilo	González-Fernández et al. (2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	81.8 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹	Batch	Mesófilo	González-Fernández et al. (2012a)
<i>Scenedesmus</i> sp.	84 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹	CSTR	Mesófilo	González-Fernández et al. (2012b)
<i>Scenedesmus</i> sp.	54 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Inglesby et al. (2015)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	209 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Caporgno et al. (2015b)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	152 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Termófilo	Caporgno et al. (2015b)
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	370 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Aramrueang et al. (2016)
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	163-342 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	CSTR	Mesófilo	Aramrueang et al. (2016)
<i>Spirulina</i> sp.	113 mLCH ₄ ·gVS ⁻¹	Batch	Mesófilo	Inglesby et al. (2015)

⁽¹⁾ AAR: Advanced flow-through Anaerobic Reactor

⁽²⁾ ADMCF: Advanced flow-through anaerobic Digester with an internal loop Microbial Cell Fuel

⁽³⁾ ASBR: Anaerobic Sequencing Batch Reactor

⁽⁴⁾ AVR: Accumulating-Volume Reactor

Según muestra la Tabla 1.5, existe una gran variabilidad en la producción de metano en función de la especie que se esté sometiendo a la digestión anaerobia. Caporgno et al. (2015b) encontraron que la especie marina *Isochrysis galsana* alcanza mayor biodegradabilidad anaerobia que la especie de agua dulce *Selenastrum*

capricornutum debido a su menor tamaño, a su carencia de pared celular y al cambio brusco de salinidad que sufren al ser introducidas en el digestor anaerobio. Diversos estudios han concluido que las especies de microalgas más adecuadas para maximizar la producción de metano, son aquellas que carecen de pared celular o cuya pared celular está compuesta por proteínas, mientras que las microalgas con una pared celular compuesta por carbohidratos, especialmente hemicelulosa, presentan biodegradabilidades muy inferiores (Dębowski et al., 2013; Mussnug et al., 2010; Ras et al., 2011). Así mismo, Frigon et al. (2013) concluyeron que no sólo la composición taxonómica afecta a la biodegradabilidad de las microalgas sino que el potencial de biometanización puede variar incluso dentro de la misma especie de microalga, en función del medio y las condiciones de cultivo.

Los numerosos estudios realizados hasta ahora, señalan a la especie *Chlamydomonas reinhardtii* como una de las microalgas con mayor potencial de producción de metano. Sin embargo, el uso de agua residual como fuente económica de nutrientes da lugar al crecimiento espontaneo de ciertas microalgas, tales como *Chlorella* y *Scenedesmus*, que predominan en el cultivo (Viruela et al., 2016). Pese a no poder seleccionar las especies de microalgas que favorecen la producción de biogás, las especies dominantes en agua residual presentan una composición de proteínas, carbohidratos y lípidos (Tabla 1.6) que les confieren un elevado potencial biometanización, según los valores de producción de biogás estimados por Heaven et al. (2011) de 446, 415 y 1014 mLCH₄·gSV⁻¹ para estos compuestos, respectivamente.

Tabla 1.6. Composición media de las microalgas predominantes en agua residual (Adaptado de Klassen et al., 2016).

Microalga	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Chlorella</i>	63	20	17
<i>Scenedesmus</i>	43	35	22

Sin embargo, estas microalgas se caracterizan por contener en su estructura una pared celular rígida que las hace resistentes a la degradación biológica, dificultando la etapa de hidrólisis y, por tanto, limitando la producción de biogás (González-Fernández et al., 2015). Esta pared celular está compuesta mayoritariamente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Vassilev and Vassileva, 2016; Voigt et al., 2014), siendo la celulosa fibrilar el compuesto que menor resistencia a la biodegradación presenta debido a que es un polímero de cadenas lineales. La hemicelulosa es un polisacárido ramificado que se une con la celulosa mediante enlaces no covalentes para darle cohesión a la célula, mientras que la lignina es un polímero aromático que se encarga de unir la celulosa fibrilar y las cadenas de hemicelulosa en una estructura tridimensional, proporcionando rigidez a la pared celular. La lignina es la parte no fermentable de la pared celular que evita que los microorganismos degraden los polisacáridos.

De los dos géneros de microalgas más comunes en cultivos alimentados con agua residual, las microalgas *Scenedesmus* se consideran de las más difíciles de biodegradar (Mussgnug et al., 2010; Tijani et al., 2015) debido a que la pared celular de esta microalga también incluye esporopolinina (González-Fernández et al., 2012b), biopolímero que incrementa su resistencia a la degradación microbiana.

Por lo tanto, dado que el uso de agua residual como fuente de nutrientes para el cultivo de biomasa algal no permite la selección de la especie con mayor potencial de producción de metano, los esfuerzos de la comunidad científica se centran en intentar maximizar la biodegradabilidad de las microalgas que crecen en este tipo de corriente. Esta biodegradabilidad puede verse incrementada con la aplicación de pretratamientos, que consigan la disrupción celular de las microalgas y faciliten así la etapa de hidrólisis, o potenciando la actividad hidrolítica de los microorganismos anaerobios.

1.5.2. Estrategias para incrementar la producción de biogás a partir de microalgas

1.5.2.1. Pretratamientos

Ha sido ampliamente reportado por la comunidad científica que la materia orgánica compleja, constituyente de la estructura de la biomasa algal, limita la eficiencia de la digestión anaerobia dado que dificulta su hidrólisis enzimática (Dębowski et al., 2013; Tijani et al., 2015). Así pues, recientes estudios han demostrado que los pretratamientos son una estrategia efectiva para conseguir la disrupción celular de la biomasa algal e incrementar la accesibilidad de los microorganismos al material orgánico intracelular, aumentando así la producción de metano.

Hasta el momento, se han estudiado distintos métodos de pretratamientos que han conseguido incrementar la biodegradabilidad de la biomasa algal, los cuales pueden clasificarse en térmicos, mecánicos, químicos e hidrolíticos (Figura 1.11). Sin embargo, estos pretratamientos todavía deben ser optimizados para mejorar el balance económico del proceso, puesto que en la mayoría de los casos el incremento de biogás producido no compensa los costes de reactivos y/o energía empleados (Cho et al., 2013; González-Fernández et al., 2013; Passos et al., 2014b).

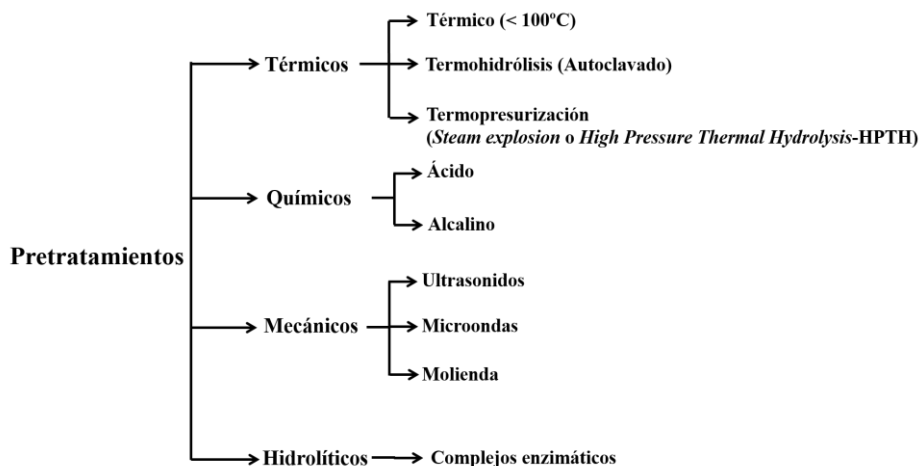


Figura 1.11. Esquema de los pretratamientos utilizados para lograr la disrupción celular de la biomasa algal (Adaptado de Passos et al., 2014b).

1.5.2.1.1. Pretratamientos térmicos

Este tipo de pretratamiento, basado en la solubilización de la biomasa algal mediante la aplicación de calor, ha sido uno de los más estudiados hasta el momento. Las temperaturas de trabajo más habituales para incrementar la producción de biogás varían entre los 50°C y los 180°C, considerándose pretratamientos *térmicos de baja temperatura* aquellos cuya aplicación se realiza a temperaturas inferiores a 100°C y a presión atmosférica. Los pretratamientos a temperaturas superiores a 100°C con un descenso gradual de la presión tras su aplicación, son los denominados de *termohidrólisis* y normalmente se realizan mediante el autoclavado de la biomasa. Sin embargo, cuando la liberación de la presión se realiza de forma instantánea, estos pretratamientos térmicos se denominan de *termopresurización* o *steam explosion*.

Los pretratamientos térmicos no requieren de una elevada aportación energética y su eficacia depende principalmente de la temperatura y el tiempo de exposición al pretratamiento. No obstante, distintos estudios han demostrado que la temperatura es el factor de mayor influencia dado que el uso de altas temperaturas da lugar a mayores porcentajes de solubilización de materia orgánica y, consecuentemente,

mayores producciones de biogás. Passos et al. (2013) observaron que el tratamiento térmico de *Chlorella* a 95°C era capaz de solubilizar compuestos que permanecían inalterados a 55°C y 75°C, mientras que un incremento del tiempo de exposición de 10 a 15 horas no daba lugar a cambios significativos en la solubilización o la biodegradabilidad de la biomasa algal. Sin embargo, detectaron que el grado de solubilización no es proporcional al incremento de la producción de metano. Estos resultados se corresponden con los reportados por González-Fernández et al. (2012b), quienes observaron que, pese a haber obtenido el mismo grado de solubilización tras pretratar *Scenedesmus* sp. a 70°C y a 90°C durante 3 horas, solo el pretratamiento de mayor temperatura produjo daño en la membrana celular de la microalga, incrementando su biodegradabilidad desde el 23% hasta el 48% ($170 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$). Posteriormente, González-Fernández et al. (2012a) corroboraron que el pretratamiento térmico a 80°C producía casi el doble de biogás que las algas sin pretratar, mientras que el porcentaje de solubilización era similar al pretratamiento realizado a 70°C y 90°C.

Estos estudios demuestran que la efectividad del pretratamiento también depende fuertemente del tipo de especie de microalga, ya que la biodegradabilidad de la *Chlorella* se ve incrementada con un pretratamiento a 50°C y maximizada a 95°C (Alzate et al., 2012; Passos et al., 2013a) mientras que temperaturas inferiores a 70°C no consiguen romper la pared celular de las microalgas *Scenedesmus* sp., demostrando su gran resistencia (González-Fernández et al., 2012b; Mahdy et al., 2014b).

Por el contrario, algunos autores han reportado el efecto nulo de pretratamientos a 50°C y 80°C sobre la biodegradabilidad de una biomasa algal dominada por *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. (Cho et al., 2013). Esto es debido a que, bajo ciertas condiciones, tienen lugar las conocidas como reacciones de Maillard, las cuales se ven fomentadas por las elevadas temperaturas, el elevado contenido en agua, el pH y la relación aminoácidos-azúcares. Estas reacciones forman compuestos recalcitrantes

que dificultan la biometanización del sustrato, pudiendo dar lugar a biodegradabilidades incluso inferiores a las de las microalgas sin pretratar (González-Fernández et al., 2012b; Passos and Ferrer, 2015). Sin embargo, Cho et al. (2013) consiguieron incrementar la biodegradabilidad de la biomasa algal mediante un pretratamiento termohidrolítico de autoclavado a 120°C durante 30 minutos, alcanzando una producción de metano de 336 mLCH₄·gSV⁻¹ muy superior a los previos estudios mostrados.

Los pretratamientos termohidrolíticos (autoclavado) requieren menores tiempos de exposición que los pretratamientos térmicos a baja temperatura para proporcionar un incremento en la biometanización del sustrato. Así pues, Mendez et al. (2013) detectaron la máxima producción de biogás tras el autoclavado de *Chlorella vulgaris* a 120°C durante 40 minutos (416.4 mLCH₄·gSV⁻¹), sugiriendo que, pese a que el balance energético es desfavorable, éste puede mejorarse incrementando la concentración de sólidos en la muestra a tratar, siempre y cuando no se vea afectada la eficiencia del pretratamiento.

El autoclavado es uno de los métodos más eficaces para la solubilización de proteínas (Ometto et al., 2014) mientras que la degradación de celulosa mediante pretratamientos térmicos, requiere de temperaturas más elevadas combinadas con cambios bruscos de presión (*steam explosion*) que produzcan la ruptura de la pared celular de las microalgas (Bohutskyi et al., 2014).

Así pues, la comparación entre pretratamientos termohidrolíticos y termopresurizados llevada a cabo a la misma temperatura (Ometto et al., 2014), confirmó que la termopresurización genera un incremento del metano producido de 259 a 336 mLCH₄·gSV⁻¹ en microalgas del género *Scenedesmus obliquus*, y de 271 a 318 mLCH₄·gSV⁻¹ para *Chlorella vulgaris*. Un resultado similar obtuvieron Alzate et al. (2012) tras aplicar un pretratamiento de termopresurización, a 170°C y 6.4 bares durante 15 minutos, sobre un cultivo mixto de *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* y *Nannochloropsis*, mientras que Keymer et al. (2013) lograron incrementar hasta un

81% la biodegradabilidad de *Scenedesmus* tras un pretratamiento a 170°C y 8 bares de presión, corroborando así la eficacia de este método. Sin embargo, en este tipo de pretratamientos también pueden tener lugar la formación de compuestos recalcitrantes mediante las mencionadas reacciones de Maillar. Mendez et al. (2014) detectaron este efecto tras obtener una biodegradabilidad inferior a 180°C y 10 bares de presión (65%) que a 160°C y 6 bares (71%).

A pesar de que estos pretratamientos incrementan considerablemente la producción de metano, suponen un elevado coste energético. Por ello, es necesario optimizar el proceso, incluyendo el balance energético y económico para comprobar su viabilidad (González-Fernández et al., 2012b; Ras et al., 2011).

1.5.2.1.2. Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos se emplean para conseguir la solubilización de la hemicelulosa y la lignina que conforman la pared celular de las microalgas. Este tipo de pretratamientos son menos habituales y normalmente se aplican de forma combinada con un tratamiento térmico, ya que por sí solos no afectan significativamente a la producción de biogás. Precisamente, Bohutskyi et al. (2014) no detectaron un impacto relevante tras pretratar *Chlorella* sp. con concentraciones de NaOH que variaban entre 0 y 21 gNaOH·L⁻¹. Sin embargo, combinando el pretratamiento alcalino con un pretratamiento termohidrolítico a 120°C y 30 minutos, alcanzaron una solubilización del 81% de la DQO total de la biomasa, como consecuencia del efecto sinérgico del pretratamiento termoquímico sobre la pared celular de las microalgas. No obstante, al igual que en los pretratamientos térmicos, el grado de solubilización no fue proporcional al incremento de producción de metano, ya que ésta solo se incrementó en un 40% (345 mLCH₄·gSV⁻¹). Este resultado fue similar al reportado por Cho et al. (2013), quienes solo encontraron un ligero aumento en la producción de metano con respecto a la biomasa algal sin tratar, de 336 a 363 mLCH₄·gSV⁻¹, cuando un cultivo mixto de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus*

sp. fue pretratado con NaOH a pH 9. Por el contrario, a valores de pH de 11 y 13, la biodegradabilidad de este cultivo fue incluso menor que la de las microalgas sin pretratar. Análogamente, Mendez et al. (2013) demostraron que tanto el tratamiento alcalino como el ácido de *Chlorella vulgaris* daban resultados muy similares (119 y 113 mL CH₄·gDQO⁻¹, respectivamente) e inferiores a la biomasa sin tratar, mientras que combinándolos con un pretratamiento térmico a 120°C durante 40 min, la producción de metano se incrementaba hasta 237.9 y 221.8 mLCH₄·gDQO⁻¹ respectivamente, correspondiéndose con una biodegradabilidad del 68.8% y el 65.4%.

El tratamiento químico realizado para extraer los lípidos a la biomasa algal, previo a su digestión anaerobia, es el que mayor influencia ha demostrado sobre la producción de biogás. No obstante, sin la aplicación de un preparamiento térmico al residuo algal, solo se alcanza un incremento de la producción del 33% (Keymer et al., 2013).

El bajo efecto de los pretratamientos químicos y la necesidad de combinarlo con pretratamientos térmicos para incrementar su eficacia, descarta este tipo de pretratamiento como método para valorizar la biomasa algal.

1.5.2.1.3. Pretratamientos mecánicos

Este tipo de pretratamientos se basa en la aplicación de procesos físicos, principalmente mediante ultrasonidos o la irradiación de microondas. Los ultrasonidos producen la ruptura de la pared celular de las microalgas mediante ciclos de compresión y descompresión que dan lugar a un proceso de cavitación. La cavitación produce incrementos de temperatura y presión, generando radicales libres altamente reactivos que degradan la pared celular. La irradiación de microondas aumenta la temperatura por un incremento en las fuerzas de fricción, provocado por la rápida oscilación del campo eléctrico, dando lugar a cambios en las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas.

De la misma forma que con el resto de pretratamientos, el grado de solubilización de la materia orgánica alcanzado no se corresponde con el incremento de la producción de metano. Alzate et al. (2012) observaron que, a pesar de que se produjo un incremento del porcentaje de materia orgánica solubilizada a medida que se incrementó la aportación energética del pretratamiento ultrasónico a la biomasa algal, la producción de metano se mantuvo constante en $309 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$. Análogamente, González-Fernández et al. (2012a) no detectaron modificaciones en los porcentajes de solubilización para aportaciones energéticas de 35.5, 47.2, 76.5, 100.7 y $128.9 \text{ MJ} \cdot \text{kgST}^{-1}$, observando que solo los dos últimos pretratamientos ultrasónicos fueron capaces de duplicar la producción de metano, alcanzando una biodegradabilidad del 41% y 44%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con Ometto et al. (2014) quienes concluyeron que son necesarias elevadas aportaciones energéticas para incrementar la producción de biogás en microalgas como *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, Passos et al. (2013b) demostraron que la irradiación de microondas equivalente a un aporte energético de $65.4 \text{ MJ} \cdot \text{kgST}^{-1}$ producen un mayor incremento de la biodegradabilidad de las microalgas cultivadas en agua residual (78% de biodegradabilidad) que un pretratamiento mediante ultrasonidos con un similar aporte energético de $67 \text{ MJ} \cdot \text{kgST}^{-1}$ (Passos et al., 2014b).

De los distintos pretratamientos descritos hasta ahora, los pretratamientos mecánicos son los que mayor coste energético suponen, por lo que es preferible el uso de pretratamientos térmicos. Sin embargo, puesto que el incremento de metano producido no compensa el coste energético en ninguno de los casos, alternativas de bajo coste deben ser estudiadas.

1.5.2.1.4. Pretratamientos hidrolíticos

Una alternativa a los pretratamientos de elevado coste energético es promover la hidrólisis enzimática de los biopolímeros que conforman la pared celular de las

microalgas. Los pretratamientos hidrolíticos se llevan a cabo mediante la adición de complejos enzimáticos comerciales cuya eficacia depende de la dosis, la temperatura, el tiempo de exposición y el pH, debiendo optimizarse estos parámetros para cada sustrato. Mahdy et al. (2014a) reportaron que las enzimas proteolíticas producen una mayor solubilización de la materia orgánica presente en *Chlorella vulgaris* que las enzimas celulolíticas, alcanzando un 54.7% de DQO soluble tras dos horas de exposición a 50°C. Así mismo, la combinación de ambas enzimas dio lugar a un incremento de la DQO soluble hasta el 67.5% tras 5 horas de exposición. En cuanto a la degradación anaerobia, tanto el pretratamiento con enzimas proteolíticas como con la combinación de enzimas dio lugar a una biodegradabilidad del 85%, muy superior a las obtenidas con otro tipo de pretratamientos. Así pues, demostraron que los pretratamientos enzimáticos son una prometedora alternativa para incrementar la producción de biogás a bajos costes energéticos. De una forma similar, Passos et al. (2016) evaluaron el efecto de una mezcla de enzimas (celulasa, glucohidrolasa y xilanasas), a 37°C durante 48 horas, sobre una biomasa algal cultivada en agua residual urbana. Tras aplicar el pretratamiento enzimático, los autores obtuvieron un incremento de la materia orgánica soluble del 126%, con respecto a su concentración inicial. A su vez, la producción de metano alcanzó los 217.3 mLCH₄·gSV⁻¹, correspondiente a un incremento del 15%. Así pues, se demuestra que potenciando la hidrólisis enzimática de la biomasa algal, se consigue incrementar la producción de metano con un coste inferior al de otros pretratamientos.

1.5.2.2. Actividad hidrolítica de la biomasa anaerobia

La capacidad hidrolítica de los microorganismos anaerobios es un factor clave a la hora de maximizar la producción de biogás a partir de materia orgánica compleja como las microalgas. La biomasa algal es degradada mediante enzimas hidrolíticas segregadas por los microorganismos de forma que potenciar la actividad hidrolítica del fango es una estrategia que puede dar lugar al incremento de la biodegradabilidad

anaerobia de las microalgas, sin la necesidad de aplicar costosos pretratamientos o la adición de enzimas sintéticas al medio. La actividad enzimática del proceso anaerobio puede verse incrementada optimizando ciertos factores como son el tiempo de retención celular y la temperatura de operación, la selección de un inóculo adecuado para las características del sustrato o la bioaumentación de la biomasa anaerobia con microorganismos específicos.

1.5.2.2.1. *Influencia del tiempo de retención celular*

El tiempo de retención celular es uno de los parámetros más importantes en la digestión anaerobia, ya que está directamente relacionado con el rendimiento de eliminación de materia orgánica del sistema. Debido a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados en el proceso anaerobio, el establecimiento de elevados tiempos de retención celular permite la adaptación de la población microbiana al sustrato, promoviendo microorganismos cuya baja tasa de crecimiento les impediría desarrollarse a bajos tiempos de retención, tales como los degradadores de compuestos recalcitrantes y los metanógenos. Así pues, trabajar con el TRC adecuado puede potenciar la actividad hidrolítica de la biomasa y, consecuentemente, la producción de metano.

Un ejemplo de ello son los diversos estudios que han demostrado el efecto del TRC sobre la biodegradabilidad anaerobia de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. La digestión anaerobia de *Chlorella vulgaris*, en un CSTR mesófilo con 15 días de TRC, solo es capaz de producir $85 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$, equivalente a un 33% de biodegradabilidad anaerobia (Mendez et al., 2015; Ras et al., 2011; Sanz et al., 2016). Sin embargo, estableciendo un TRC de 28 días dicha biodegradabilidad se incrementa hasta el 51% (Ras et al., 2011). De forma similar, la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* sp. se incrementa de 9.4% a un 24% modificando el TRC de 15 a 23 días (González-Fernández et al., 2013; Tran et al., 2014). Estos resultados sugieren que operar los digestores a TRC superiores a los estudiados hasta

ahora, podría incrementar la biodegradabilidad de las algas y mejorar la producción de biogás. En base a las distintas configuraciones de reactores anaerobios descritas, una propuesta prometedora para maximizar la recuperación energética de la biomasa algal en forma de biogás es llevar a cabo su digestión anaerobia en un AnMBR. La tecnología de membranas permitiría trabajar a elevados tiempos de retención celular, manteniendo elevados caudales de tratamiento y, a su vez, reduciría los costes de concentración previa de las microalgas ya que pueden ser alimentadas con un mayor contenido en agua, sin riesgo de que se produzca el lavado de microorganismos del digestor.

1.5.2.2.2. Influencia de la temperatura de operación

La temperatura es uno de los parámetros de mayor influencia sobre las reacciones cinéticas asociadas al metabolismo de los microorganismos. El establecimiento de una temperatura operacional termófila da lugar a una comunidad microbiana de mayor velocidad de crecimiento y actividad enzimática que en condiciones mesófilas. De esta forma, se puede obtener una mayor degradación de la biomasa algal sin necesidad de incrementar el tiempo de retención celular y, por tanto, con menores necesidades de volumen en el caso de utilizar una configuración convencional como el CSTR. Lü et al. (2013) obtuvieron una biodegradabilidad de *Chlorella vulgaris* del 50% bajo condiciones termófilas, un valor superior al 30-33% que obtuvieron otros autores en condiciones mesófilas (Passos et al., 2014a).

Sin embargo, el elevado contenido de proteínas en las microalgas da lugar a una elevada solubilización de amonio durante su digestión anaerobia (Toledo-Cervantes et al., 2016; Uggetti et al., 2014). Esta elevada concentración de amonio junto con la elevada temperatura favorece la formación de amoníaco en el sistema, el cual puede inhibir el proceso y cuya formación se incrementa a medida que asciende el pH. Olsson et al. (2014) detectaron una disminución de la eficiencia de la digestión anaerobia de *Scenedesmus* y *Chlorella vulgaris* en condiciones termófilas en

comparación con la digestión mesófila, debido a la elevada presencia de amonio/amoniaco en el reactor, corroborando que los procesos termófilos son más propensos a inestabilidades. Este problema podría verse resuelto con una adecuada estrategia de operación: controlando la carga máxima que podría tratar el sistema sin inhibirse, llevando a cabo una co-digestión con sustratos que incrementaran la relación C/N o utilizando una biomasa algal más diluida, ya que permitiría reducir la concentración de nitrógeno en el reactor.

1.5.2.2.3. Selección del inóculo

La selección del inóculo en función del sustrato a degradar y las condiciones operacionales, puede reducir el tiempo de arranque del digestor y facilitar la adaptación de los microorganismos al nuevo sustrato. De esta forma, podría potenciarse la biodegradabilidad anaerobia, asegurando la estabilidad del proceso a largo plazo (De Vrieze et al., 2014). Uno de los primeros criterios a seguir para seleccionar un inóculo es la temperatura a la que se va a operar el digestor, ya que la mayoría de microorganismos involucrados en un proceso de digestión anaerobia en condiciones mesófilas, no son capaces de soportar los rangos de temperatura termófilos. Así mismo, el inóculo debe poseer una composición y distribución microbiana que le confiera una elevada actividad hidrolítica sobre un sustrato similar al que se pretende degradar. En el caso de la digestión anaerobia de microalgas, una adecuada opción sería emplear un fango adaptado a la degradación de material lignocelulósico. Por último, en la selección del inóculo deben tenerse en cuenta los posibles factores que puedan alterar la eficiencia del proceso como puede ser la presencia de inhibidores. Dado que la digestión anaerobia de microalgas solubiliza las proteínas en amonio, y puede dar lugar a inhibiciones por amoniaco, el inóculo más adecuado sería aquel estuviera adaptado a elevadas concentraciones de este inhibidor (Mahdy et al., 2017), como puede ser un fango procedente de la digestión anaerobia de purines.

1.5.2.2.4. Bioaumentación

Una estrategia alternativa para incrementar la actividad hidrolítica de la biomasa es inocular bacterias específicas, capaces de hidrolizar los compuestos de la pared celular de las microalgas. Estas bacterias hidrolíticas deben ser cuidadosamente seleccionadas para que sean efectivas en la degradación de la biomasa algal y compatibles con el sinérgico proceso de digestión anaerobia. Considerando que las microalgas que crecen espontáneamente en agua residual presentan una pared celular compuesta mayoritariamente por polisacáridos, las bacterias celulolíticas representan un grupo adecuado con el que bioaumentar la población microbiana. Lü et al. (2013) consiguieron incrementar la biodegradabilidad anaerobia de *Chlorella vulgaris* de 50% ($318 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$) a 63.4% ($403 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$), bioaumentando una digestión termófila con un 10% de *Clostridium thermocellum*. De la misma forma, la bioaumentación de un reactor termófilo ASBR con esta misma bacteria, para degradar *Haematococcus pluvialis*, dio lugar a un resultado similar, incrementando la producción de metano de 320 a 499 $\text{mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$ tras bioaumentar la población microbiana en un 15% (Aydin, 2016). Estos resultados demuestran que la introducción de un cultivo específico de bacterias puede dar lugar a una mejora en la producción de biogás, no solo por la presencia del microorganismo inoculado sino por los cambios que genera en la población microbiana al interactuar con el resto de microorganismos.

1.5.2.3. Biomasa involucrada en la digestión anaerobia de microalgas

El conocimiento de los microorganismos involucrados en la degradación anaerobia de las microalgas proporciona una valiosa información para la optimización del proceso, ya que permite anticipar la respuesta del sistema ante perturbaciones del ambiente o el proceso, así como establecer parámetros de referencia para alcanzar un buen rendimiento y prevenir posibles fallos en el proceso (Carballa et al., 2015). Sin embargo, aunque la comunidad microbiana de digestores anaerobios

convencionales ha sido ampliamente investigada, los estudios relacionados con los microorganismos con una elevada capacidad de degradación de microalgas son todavía escasos. La ausencia de un proceso optimizado que permita maximizar la biodegradabilidad de la biomasa algal sin tratamientos previos, junto con la elevada diversidad filogenética y la redundancia funcional de algunos microorganismos, dificulta el establecimiento de una estrategia microbiana para controlar este proceso.

Tradicionalmente, la identificación de poblaciones clave, capaces de llevar a cabo metabolismos específicos de la digestión anaerobia, se ha realizado mediante técnicas de cultivo. Sin embargo, muchos de los microorganismos implicados en este proceso no han podido ser aislados y cultivados. Así pues, el completo conocimiento de la ecología microbiana de la digestión anaerobia requiere de la combinación de estas técnicas tradicionales con avanzadas técnicas moleculares, tales como la secuenciación masiva NGS (*Next-Generation Sequencing*) y las técnicas ómicas, que permitan conocer la diversidad filogenética y metabólica del sistema.

Uno de los primeros estudios que utilizó técnicas moleculares para la identificación de microorganismos durante la digestión anaerobia de microalgas fue el descrito por Ellis et al. (2012). Estos autores identificaron y cuantificaron los microorganismos metanógenos presentes en una digestión anaerobia mesófila de biomasa algal mediante pirosecuenciación (GS FLX 454, Roche), detectando una elevada biodiversidad. De entre las archaeas identificadas, el género *Methanosaeta* perteneciente al orden Methanosarcinales fue el más abundante y, dado que *Methanosaeta* es un acetotrofo obligado, estos resultados indicaron que la producción de metano se producía principalmente por vía acetoclástica. Wirth et al. (2015) también detectaron el género *Methanosaeta* como el más abundante del dominio Archaea, en la digestión anaerobia de *Scenedesmus* sp. en condiciones mesófilas, mediante Ion PGM (Torrent - Life Technologies). En cuanto al dominio Bacteria, estos autores detectaron Bacteroidetes como el phylum de mayor abundancia relativa (53%), seguido de Firmicutes (27%) y Proteobacteria (8%). Los

microorganismos pertenecientes a estos phyla han sido descritos como degradadores de proteínas y polisacáridos, ambos constituyentes de la estructura de este tipo de microalgas. En cambio, en el caso de la digestión mesófila de *Chlorella vulgaris*, Sanz et al. (2016) detectaron, mediante pirosecuenciación (454 FLX + System, Roche), que las bacterias con capacidad proteolítica dominaban frente a los microorganismos sacarolíticos. El elevado contenido en proteínas de estas microalgas es lo que dio lugar a una distinta distribución de la comunidad microbiana del reactor, siendo en este caso el phylum Proteobacteria el de mayor abundancia relativa (50%), seguido de Bacteroidetes (19%), Chloroflexi (9%) y Firmicutes (8%).

Así mismo, Aydin (2016) identificó, mediante MiSeq (Illumina), Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes como los phyla dominantes en la digestión termófila de las microalgas *Haematococcus pluviales*, otra de las especies de microalga con una pared celular rígida resistente a la degradación anaerobia. Sin embargo, tras bioaumentar el sistema con *Clostridium thermocellum* como se ha detallado en el apartado 1.5.2.2.4 (pág. 75), la comunidad microbiana sufrió un cambio en su composición que estableció a los phyla Firmicutes y Bacteroidetes como los dominantes del sistema. Estos resultados indican que los microorganismos pertenecientes a estos phyla son capaces de degradar las microalgas con una elevada eficiencia. En cuanto al dominio Archaea, la elevada abundancia relativa de metanógenos hidrogenotróficos, junto con la de microorganismos sintróficos, determinó que la producción de metano a partir de esta microalga tenía lugar principalmente por esta vía, en condiciones termófilas.

Así pues, pese a que la mayoría de estos estudios no consiguieron obtener una elevada producción de biogás a partir de microalgas, parece que la biodegradabilidad podría incrementarse si se potenciaran las bacterias degradadoras de los componentes principales de las microalgas: proteínas y polisacáridos. De esta forma, la presencia y abundancia relativa de este tipo de microorganismos hidrolíticos podrían considerarse como indicadores de la eficiencia del proceso.

Objetivos

2. Objetivos

Ante la necesidad de desarrollar nuevos procesos y tecnologías sostenibles, que minimicen el uso de recursos y la generación de residuos, los tratamientos de aguas residuales están evolucionando para maximizar la recuperación de recursos hídricos y de nutrientes, así como la valorización energética de la materia orgánica presente en ellas. El tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas mediante la tecnología AnMBR, y su post-tratamiento mediante el cultivo de microalgas, representa una alternativa viable a los tratamientos convencionales tanto por su sostenibilidad, como por la producción económica de una biomasa algal que puede ser valorizada en forma de energía renovable.

El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en estudiar la digestión anaerobia de la biomasa algal, procedente del efluente de un tratamiento anaerobio de agua residual urbana, con el fin de maximizar su valorización energética en forma de biogás. El presente trabajo se enmarca dentro del Subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI) con referencia BES-2012-055972, concretamente en el proyecto CTM2011-28595-C02-01/02 que tiene por título **Estudio experimental de la recuperación como biogás de la energía de la materia orgánica y nutrientes del agua residual, acoplando un AnMBR y un cultivo de microalgas**, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

Las microalgas que crecen en este tipo de corriente (efluente de un AnMBR), habitualmente *Scenedesmus* y *Chlorella*, presentan una elevada resistencia a la degradación biológica, lo que convierte a la hidrólisis en la etapa limitante del proceso. Para incrementar la biodegradabilidad anaerobia de la biomasa algal, se han llevado a cabo dos estrategias: (i) Pretratamiento de la biomasa algal y (ii) potenciación de la actividad hidrolítica de la propia biomasa anaerobia mediante la operación de un digestor mesófilo a elevado TRC y la operación de un digestor termófilo a 55°C.

Para la consecución del objetivo principal de la tesis, se han planteado los siguientes subobjetivos específicos:

1. Estudio del potencial de biometanización de las microalgas cultivadas en el efluente del tratamiento anaerobio de agua residual urbana.
 - Estudio en *batch* de la influencia del inóculo sobre la biodegradabilidad anaerobia de la biomasa algal.
 - Estudio del pretratamiento enzimático de la biomasa algal y establecimiento de las condiciones más favorables que incrementan su biodegradabilidad.
2. Estudio de la digestión anaerobia de microalgas en continuo bajo condiciones mesófilas.
 - Determinación de las condiciones operacionales del reactor que potencian la actividad hidrolítica de la biomasa anaerobia. Evaluación del efecto del tiempo de retención celular, del tiempo de retención hidráulico, de la velocidad de carga orgánica y de la configuración del reactor sobre la biodegradabilidad de la biomasa algal y la estabilidad del proceso biológico.
 - Evaluación de la producción de fangos y de la concentración de sólidos alcanzada en el reactor en función del rendimiento del proceso.
 - Evaluación de la calidad del efluente y de su potencial de reutilización para el cultivo de nueva biomasa algal.
3. Estudio de la digestión anaerobia de microalgas en continuo bajo condiciones termófilas.
 - Estudio de la influencia de la temperatura sobre la degradación anaerobia de microalgas.

- Estudio del efecto de la velocidad de carga orgánica y del tiempo de retención celular sobre la degradación de las microalgas y la estabilidad del proceso biológico.
 - Evaluación de la producción de fangos y de la concentración de sólidos alcanzada en el digestor anaerobio termófilo.
 - Estudio de la inhibición del proceso biológico por la formación de amoníaco.
4. Estudio de los microorganismos implicados en la degradación anaerobia de las microalgas.
- Análisis de la biodiversidad de las comunidades microbianas en ambos reactores: mesófilo y termófilo.
 - Identificación de la comunidad microbiana involucrada en la degradación de las microalgas bajo condiciones mesófilas, y que deben ser favorecidos para alcanzar una elevada eficiencia del proceso.
 - Identificación de los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia de la biomasa algal bajo condiciones termófilas.
 - Estudio de la influencia de la población procariota presente en la biomasa algal sobre las comunidades microbianas establecidas en ambos reactores (mesófilo y termófilo), dado que las microalgas no provienen de cultivos puros.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Biomasa microalgal

Las microalgas, empleadas como sustrato para la digestión anaerobia, proceden de un sistema de fotobioreactores con membranas de ultrafiltración a escala de planta piloto, denominado MPBR (*Membrane PhotoBioReactor*). Este sistema es empleado como estrategia sostenible para eliminar nutrientes del efluente procedente del tratamiento anaerobio de aguas residuales en una planta AnMBR a escala de demostración. Ambas plantas piloto pertenecen al grupo de investigación CALAGUA y se encuentran situadas en la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia, España).

La planta AnMBR trata anaeróbicamente agua residual urbana real procedente del pretratamiento de la EDAR, es decir, tras el desbaste y el desarenado-desengrasado. Esta planta piloto, cuya imagen se muestra en la Figura 3.1, consta de un rotofiltro de 0.5 mm de diámetro de paso, un tanque de regulación de 300 L, un reactor anaerobio de 900 L de volumen de trabajo, dos módulos de membrana de ultrafiltración con una superficie útil de 30 m² y una tamaño de poro de 0.03 µm, sumergidos en sendos tanques externos de 600 L de volumen de trabajo, y un tanque de almacenamiento del permeado de 200 L. El funcionamiento y operación de esta planta, así como la automatización y el sistema de control utilizado han sido previamente detallados por Giménez et al. (2011).



Figura 3.1. Vista general de la planta AnMBR a escala de demostración.

La elevada eficiencia de eliminación de materia orgánica de esta planta piloto da lugar a un efluente de alta calidad, que está libre de sólidos suspendidos y patógenos gracias al uso de membranas de ultrafiltración (Giménez et al., 2011; Moñino et al., 2017). Sin embargo, presenta elevadas concentraciones de nutrientes, los cuales pueden ser recuperados en forma de biomasa algal (Ruiz-Martinez et al., 2012). Por ello, este efluente es posteriormente tratado mediante la acción de microalgas en fotobioreactores a escala piloto.

La planta piloto MPBR, la cual se muestra en la Figura 3.2, está constituida por cuatro fotobioreactores de placa plana, de 550 L de volumen de trabajo cada uno, y dos módulos de membrana de ultrafiltración que consiguen separar la biomasa microalgal del efluente ya tratado, los cuales presentan las mismas características que los empleados en la planta AnMBR. El funcionamiento y operación de esta planta piloto ha sido previamente descrito de forma detallada por Viruela et al. (2016), siendo *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp. los principales géneros de

microalgas que predominaron durante todo el periodo experimental. Estos géneros fueron determinados morfológicamente mediante métodos de microscopía de epifluorescencia (Viruela et al., 2016; Pachés et al., 2012), empleando un microscopio Leica DM2500, que permite llevar a cabo la cuantificación del número de células eucariotas (células·L⁻¹).



Figura 3.2. Vista general de la planta piloto MPBR.

La biomasa algal en exceso, purgada de la planta MPBR, será sometida a una digestión anaerobia con el fin de valorizarla energéticamente en forma de biogás. Sin embargo, esta biomasa algal presenta un elevado contenido en agua y debe ser concentrada para poder llevar a cabo la digestión anaerobia con una adecuada carga orgánica. El concentrado de las microalgas se llevó a cabo mediante filtración, usando una membrana externa de flujo tangencial, cuyo esquema y vista general se muestran en la Figura 3.3.

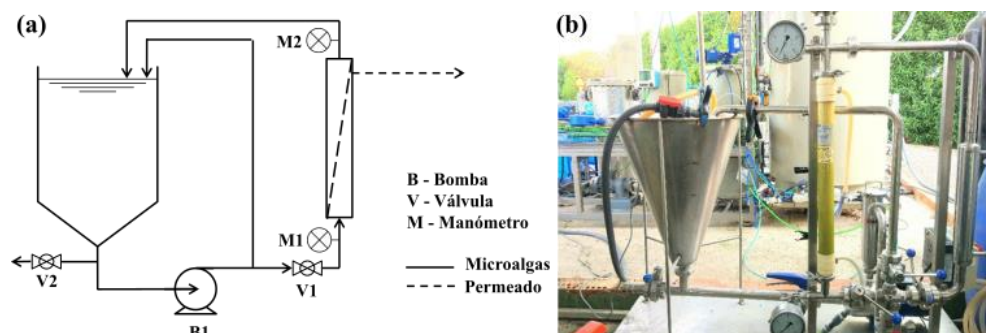


Figura 3.3. Esquema (a) y vista general (b) del sistema de membrana externa de flujo tangencial para concentrar la biomasa algal.

Este sistema para concentrar algas consta de un tanque de 40 L empleado para alimentar el sistema, una bomba centrífuga B1 (modelo 5HM04N05T5RVBE 240V 1Ph 50Hz, LOWARA) y una membrana de ultrafiltración, de fibra hueca y flujo tangencial (modelo HF 5.0-43-PM500, PURON® Koch Membrane Systems), con 1.092 m de longitud, un área de filtración de 2.1 m² y un tamaño de poro medido en MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) de 500000 Dalton. La biomasa algal es bombeada desde el tanque a través de la membrana, generando la velocidad de flujo necesaria para que la filtración tenga lugar.

La presión transmembrana es controlada con dos manómetros, uno instalado a la entrada de la membrana (M1) y otro a la salida (M2), manteniéndose las presiones en 1.8 bar y 0.5 bar respectivamente. Ambas presiones y, por tanto, el caudal de trabajo, son reguladas mediante una válvula de bola (V1) que permite derivar parte de la corriente de nuevo al tanque, sin pasar por la membrana. A su vez, las microalgas concentradas también son retornadas al tanque de alimentación de forma que, conociendo el valor de la DQO (Demanda Química de Oxígeno) inicial, el equipo se mantendrá en funcionamiento hasta que se filtren los litros de microalgas suficientes para obtener un volumen final de 20 L con la DQO deseada. Una vez finalizado el proceso de concentración, la biomasa algal es descargada del sistema a

través de la válvula de bola (V2) y almacenada en nevera a 4°C por un periodo máximo de un mes.

Una vez obtenida la biomasa algal, ésta se caracteriza en términos de demanda química de oxígeno total (DQO_T) y soluble (DQO_S), sólidos totales (ST) y volátiles (SV), sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), nitrógeno total (N_T) y soluble (N_s), fósforo total (P_T), amonio, fosfato y sulfato.

3.2. Biodegradabilidad anaerobia de la microalgas.

Pretratamiento enzimático

La biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. fue evaluada mediante ensayos en *batch* de determinación del potencial bioquímico de metano (BMP, *Biochemical Methane Potential*). Inicialmente, se procedió a estudiar la influencia del inóculo en la degradación de este sustrato, ya que su elevada resistencia a la biodegradación requiere de una biomasa anaerobia con una elevada actividad hidrolítica. Para llevar a cabo este estudio, se realizaron ensayos de BMP de las microalgas sin pretratar con tres inóculos distintos:

- Inóculo procedente de un digestor mesófilo convencional, en el cual se estabilizan los fangos producidos en el tratamiento de un agua residual urbana. Concretamente, este inóculo se tomó del digestor anaerobio perteneciente a la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia, España).
- Inóculo procedente del tratamiento anaerobio conjunto de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) y de agua residual urbana (ARU), en la planta piloto AnMBR.
- Inóculo adaptado a la digestión anaerobia de microalgas, llevada a cabo en un reactor AnMBR a escala de laboratorio.

Una vez seleccionado el inóculo en base a su mayor rendimiento para la degradación anaerobia de microalgas, se realizó un estudio de pretratamiento de las microalgas *Scenedesmus* spp. empleando el complejo enzimático Viscozyme® L (Novozymes Corp.). Este complejo enzimático está constituido por una mezcla de enzimas sacarolíticas con una actividad enzimática de $100 \text{ FBGU} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Fungal Beta-Glucanase Units*), capaces de degradar polisacáridos entre los que se incluyen la celulosa y la hemicelulosa, ambos constituyentes de la pared celular de este tipo de microalga. Viscozyme® L fue inicialmente desarrollado para la hidrólisis enzimática de plantas terrestres, por lo que sus condiciones de aplicación deben ser optimizadas para el sustrato que se pretende degradar. Para ello, se realizó un diseño experimental siguiendo un diseño factorial completo en el que se estudia el efecto de 3 factores a dos niveles: dosis, pH y temperatura, con el objetivo de determinar las condiciones que maximizan la producción de biogás. La variación de los 3 factores se realizó partiendo de las condiciones reportadas por Mahdy et al. (2014), quienes determinaron una elevada hidrólisis de las microalgas *Chlorella vulgaris* aplicando una dosis de $0.3 \text{ mL} \cdot \text{gST}^{-1}$, un pH de 5.5 y una temperatura de 50°C durante un tiempo de 5 horas. Por lo tanto, las combinaciones de los distintos factores dieron lugar a la realización de 8 ensayos, cuyas condiciones operacionales junto con su codificación correspondiente al diseño factorial se muestran en la Tabla 3.1. En esta tabla, el factor X_1 se corresponde con la dosis, el factor X_2 con el pH y el factor X_3 con la temperatura. Además, se realizaron tres réplicas del punto central para cuantificar el error experimental, junto con una serie de ensayos en los que también se estudió el efecto sobre la producción de biogás de aplicar únicamente el tratamiento térmico de 50°C durante 5 horas (sin enzima), así como el efecto de la variación del pH, tal y como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.1. Diseño factorial con los valores codificados y los valores reales de los factores variados en el pretratamiento enzimático.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Dosis (mL·gST ⁻¹)	pH	T (°C)
N1	-1	-1	-1	0.1	4.5	40
N2	1	-1	-1	0.5	4.5	40
N3	-1	1	-1	0.1	6.5	40
N4	1	1	-1	0.5	6.5	40
N5	-1	-1	1	0.1	4.5	60
N6	1	-1	1	0.5	4.5	60
N7	-1	1	1	0.1	6.5	60
N8	1	1	1	0.5	6.5	60

Como puede verse en la Tabla 3.1, el valor codificado como -1 se corresponde con el valor bajo de los factores y el 1 con el valor alto de los mismos, siendo su distribución espacial mostrada en Figura 3.4.

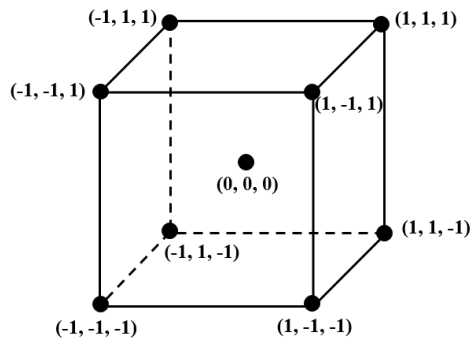


Figura 3.4. Distribución espacial del diseño factorial completo en el que se estudian 3 factores a 2 niveles.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales de los ensayos empleados para evaluar el efecto de la temperatura y la variación del pH sobre las condiciones reportadas por Mahdy et al. (2014).

Ensayo <i>batch</i>	T (°C)	Dosis (mL·gST⁻¹)	pH
E1	50	0.3	6.5
E2	50	0.3	libre
E3	50	0.3	4.5
E4 ⁽¹⁾	50	0.3	5.5
E5	50	0	5.5

⁽¹⁾ Condiciones experimentales reportadas por Mahdy et al. (2014). Experimento realizado por triplicado.

El protocolo para llevar a cabo la hidrólisis enzimática fue similar al reportado por Mahdy et al. (2014), el cual consiste en añadir la dosis de enzima seleccionada, ajustar el pH con HCl o NaOH diluidos e introducir en un baño térmico, a la temperatura de estudio, durante 5 horas. El pH se mantiene en el valor deseado a lo largo de las 5 horas de pretratamiento, mediante un sistema de control. Una vez finalizado el pretratamiento, la biomasa algal es sometida a 75°C durante 15 minutos para desactivar la enzima, tras lo cual se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se almacena a 4°C.

De la misma forma que en el estudio de selección del inóculo, la variable respuesta de los estudios de pretratamiento fue la cantidad de metano producida por gramo de DQO de microalgas.

Determinación de la biodegradabilidad

El ensayo BMP permite estimar el metano que produce la digestión anaerobia de microalgas en *batch*, bien sean frescas o tras un pretratamiento y, por tanto, la biodegradabilidad de las mismas. Los ensayos de BMP se llevaron a cabo en un equipo AMPTS II (*Automatic Methane Potential Test System*, Bioprocess Control).

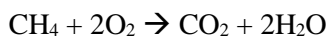
Este equipo consta de una serie de reactores en *batch* de 500 mL de volumen, cerrados herméticamente y con agitación mecánica. El espacio de cabeza de cada reactor se encuentra conectado a una celda que mide el metano producido por desplazamiento de líquido, la cual registra la producción de metano cada 10 mL. El biogás producido en los reactores, previamente atraviesa una solución de NaOH (3M) antes de ser medido por la celda, con el fin de que ésta solo contabilice la producción de metano.

La preparación de los ensayos se realiza añadiendo al reactor un volumen de 400 mL de la mezcla inóculo-microalgas con una relación de $0.5 \text{ gDQO}_{\text{microalgas}} \cdot \text{gSV}_{\text{inóculo}}^{-1}$, con el fin de prevenir la acidificación del ensayo (Alzate et al., 2012). A su vez, se prepara también un blanco, es decir, un reactor con el mismo volumen de inóculo que el resto de muestras pero en el que se emplea agua en lugar de sustrato para completar los 400 mL de volumen de reacción. El blanco permite conocer la producción de metano debida al inóculo y, por tanto, determinar el metano neto producido por diferencia entre la muestra y el blanco. Una vez cerrado el reactor, se burbujea N_2 durante un minuto con el fin de eliminar la presencia de oxígeno, creando así una atmósfera anaerobia. El experimento se considerará finalizado cuando la velocidad de producción de metano sea inferior a $5 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$.

El valor de BMP obtenido de los ensayos se corresponderá con la producción de metano, normalizada por gramo de DQO o SV de microalgas introducidas. Por tanto, este ensayo permite conocer la biodegradabilidad de las microalgas, comparando el volumen de metano obtenido en los ensayos con el volumen máximo de metano teórico.

El volumen teórico de metano se calcula estequiométricamente, a partir del valor de DQO de las microalgas introducidas en el reactor. Puesto que de la reacción de oxidación del metano se obtiene que se necesitan 64 g de O_2 para oxidar un mol de CH_4 , aplicando la ley de los gases ideales (Ec. 3.1) se calcula que se producen 350

mL de metano por cada gramo de DQO, en condiciones normales (0°C y 1 atm), tal y como se muestra a continuación:



$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad [\text{Ec. 3.1}]$$

$$V = (1 \text{ mol CH}_4/64 \text{ g O}_2) \cdot 0.082 \cdot 273.15 = 0.35 \text{ L} = 350 \text{ mL}$$

El equipo AMPTS II realiza automáticamente la corrección por presión y temperatura, transformando el valor de metano producido a condiciones normales. Por ello, para el cálculo de la biodegradabilidad, deberán compararse los valores obtenidos experimentalmente con las producciones teóricas calculadas también en condiciones normales.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de BMP obtenidos del diseño factorial, fueron analizados mediante el programa STATGRAPHICS (v 17.2.02). Para ello se desarrolló un modelo de regresión que expresa la variable respuesta (BMP) como una función lineal de los factores, sus interacciones y un término de error. Este modelo sigue la formulación de la ecuación 3.2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + E \quad [\text{Ec. 3.2}]$$

Donde Y representa la respuesta predicha por el modelo y X_1 , X_2 y X_3 son los tres factores estudiados: dosis, pH y T respectivamente. Los coeficientes de regresión del modelo son representados por β_0 , β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} y β_{23} , mientras que E representa el error estándar.

La metodología de superficies de respuesta (RSM - *Response Surface Methodology*) es una técnica estadística útil cuando la respuesta está influenciada por distintas variables (Oehlert, 2003), que permite describir el proceso mediante la obtención de un modelo polinomial, que estima la respuesta de cada uno de los efectos y de las interacciones entre ellos.

La proporción de la variabilidad de los datos que el modelo es capaz de explicar, se determinó mediante el cálculo del coeficiente R^2 . La significancia estadística de cada uno de los factores estudiados así como de la combinación de los mismos, fue evaluada mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, es decir, aquellos efectos que tengan un p-valor inferior a 0.05 se puede considerar que son significativos.

3.3. Descripción de los reactores y las condiciones operacionales

Paralelamente a los ensayos en *batch*, la digestión anaerobia de microalgas fue llevada a cabo en dos reactores operados en continuo, uno en condiciones mesófilas y otro en condiciones termófilas. Ambos reactores fueron sellados para prevenir la entrada de aire y las fugas de biogás, y fueron equipados con sensores internos de temperatura, pH, potencial de oxidación-reducción y presión para monitorizar el proceso. Los valores de estas sondas fueron continuamente registrados y graficados mediante un software de adquisición de datos desarrollado por el grupo de investigación CALAGUA.

La temperatura se mantuvo constante en ambos reactores mediante sendas camisas de agua, conectadas a dos baños con control de temperatura. El volumen de biogás producido fue medido mediante un caudalímetro de gas conectado a la cabeza de los reactores, capaz de registrar tanto el caudal como el volumen acumulado del biogás producido diariamente (μ Flow, Bioprocess Control). Las corrientes efluentes de ambos reactores se analizaron una vez por semana en términos de DQO_T , DQO_s , ST , SV , SST , SSV , N_T , N_s , P_T , NH_4^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . El análisis del porcentaje de metano en el biogás se realizó tres veces por semana mediante un cromatógrafo de gases provisto con un detector de ionización de llama (GC-FID, Thermo Scientific).

3.3.1. Reactor mesófilo

La degradación anaerobia en condiciones mesófilas fue inicialmente llevada a cabo en un reactor CSTR de 11.5 L de volumen total y 2.5 L de espacio de cabeza. La temperatura de operación se mantuvo en 35°C durante toda la experimentación y la homogenización del sistema se realizó mediante la recirculación del propio biogás producido. El biogás es aspirado del espacio de cabeza por medio de dos soplantes (modelo HX10 05 P1 230V 50/60Hz, EAD), y reintroducido por la parte inferior del reactor. La Figura 3.5 muestra un esquema y una vista general de este reactor.

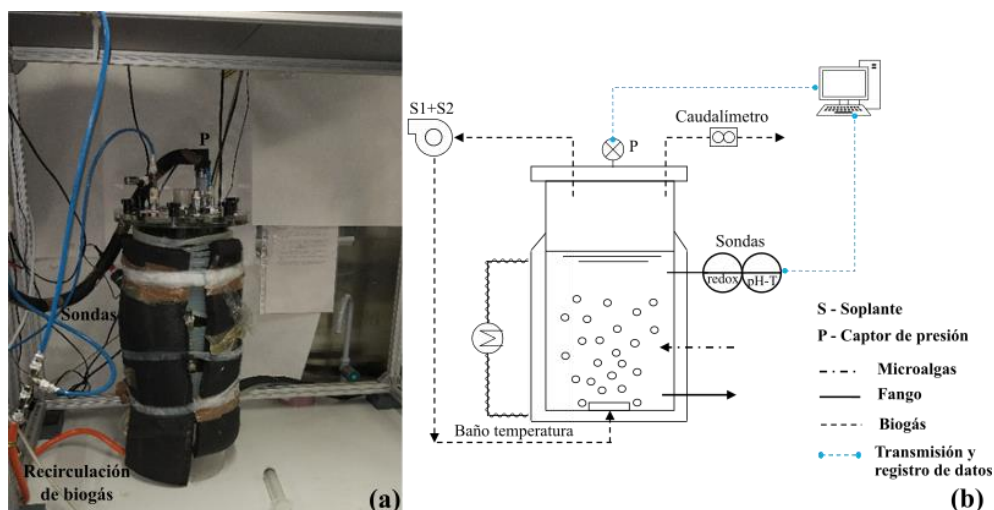


Figura 3.5. Vista general (a) y esquema (b) del reactor CSTR en condiciones mesófilas.

Este reactor fue inoculado con 9 L de fango mesófilo, procedente de un digestor anaerobio convencional ubicado en la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia, España). Una vez inoculado, el reactor fue purgado y posteriormente alimentado con biomasa microalgal fresca (sin pretratar) una vez al día, durante toda la experimentación, manteniendo las condiciones operacionales mostradas en la Tabla 3.3 (pág. 102) bajo la nomenclatura de periodo M-I.

Tras 143 días de experimentación, la configuración del reactor fue modificada conectándole una membrana de ultrafiltración de fibra hueca (modelo PUR-ON®,

Koch Membrane Systems), con el fin de poder desacoplar el TRH del TRC. Esta membrana, de 0.42 m² de superficie de filtración y un diámetro nominal de poro de 0.03 µm, se encuentra sumergida en un módulo de 0.9 L de volumen. El sistema de reactor y módulo de membrana, denominado AnMBR, cuyo esquema y vista general se muestran en el Figura 3.6, se mantuvo homogenizado gracias a la continua recirculación del fango desde el reactor al módulo mediante bombeo (B1). Para minimizar la acumulación de los sólidos sobre la membrana (*fouling*), una parte del biogás producido es recirculado desde la cabeza del reactor a la parte inferior de la membrana mediante una soplante (S3) (modelo ZR P4 24V dc, EAD). El reactor AnMBR, cuyo volumen total es de 12.4 L con 2.5 L de espacio de cabeza, es purgado directamente del tanque reactor mientras que el permeado es obtenido mediante la presión negativa que ejerce una bomba peristáltica (B2) conectada al módulo de membrana. La purga, el filtrado y la posterior alimentación del reactor se realizaron diariamente.

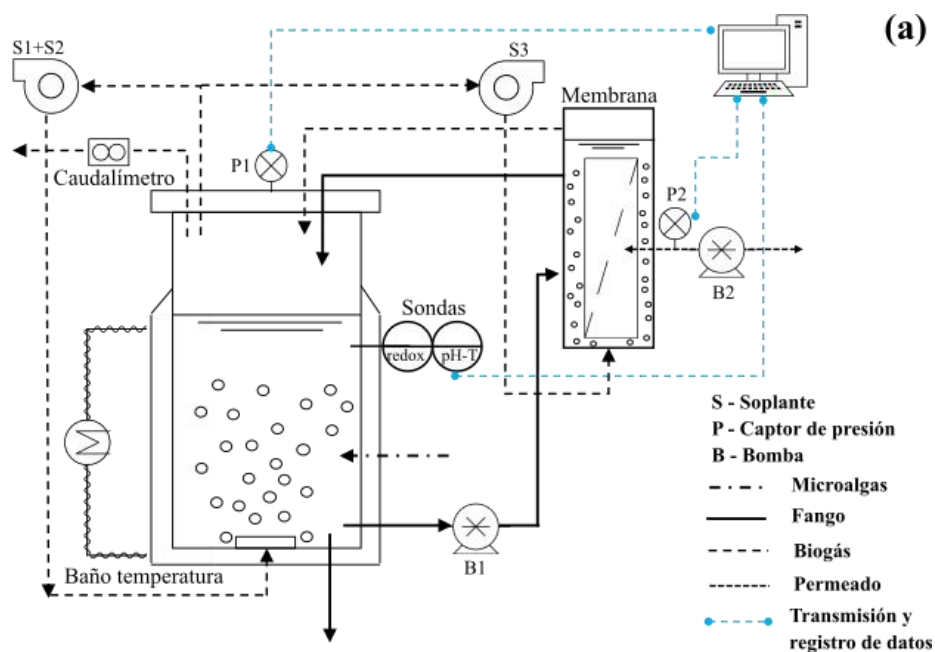


Figura 3.6. Esquema (a) y vista general (b) del reactor mesófilo AnMBR.

Para llevar a cabo la filtración, la bomba de permeado (B2) se conectó a un controlador, el cual fue programado para que la membrana trabajara en tres etapas de operación: Filtración, contralavado y relajación.

- **Filtración:** La etapa de filtración empieza tras el purgado del reactor, finalizando cuando se ha alcanzado el volumen de permeado establecido para mantener el TRH. Durante esta etapa, la bomba (B2) ejerce una presión negativa sobre el lado interior de las fibras de la membrana, que proporciona la fuerza impulsora necesaria para que un determinado flujo de permeado pase a través de la pared de las mismas (flujo transmembrana).
- **Contralavado:** En esta etapa, parte del permeado es impulsado en dirección contraria a la filtración (B2) con el objetivo de eliminar el fouling reversible de la superficie de la membrana. Esta etapa se realiza cada 120 segundos de filtración, teniendo una duración de 20 segundos. La bomba B2 está conectada a un controlador, el cual alterna las etapas de filtración y contralavado cambiando el sentido de funcionamiento de la bomba.
- **Relajación:** En esta etapa la bomba (B2) permanece parada y no existe flujo en ninguna dirección a través de la membrana. De esta forma se elimina el vacío del interior de las fibras, provocado por el proceso de filtración, y se favorece la eliminación de una parte de la torta formada sobre la superficie exterior de las fibras, gracias al burbujeo continuo del biogás. Una vez alcanzado el volumen de permeado, tras las etapas de filtrado-contralavado, la membrana permanecerá en relajación el resto del tiempo.

El rendimiento de la membrana fue monitorizado mediante el registro y graficado diario de la presión transmembrana (PTM), con el fin de evitar que se alcanzaran valores que dieran lugar al daño de la membrana. Esta PTM se midió como la diferencia de presión entre el valor proporcionado por el captor de presión situado en la cabeza de reactor (P1) y el valor de otro captor situado en la conducción de

permeado (P2), inmediatamente después de la membrana y antes de la bomba de permeado (B2). Dado que los valores de PTM se mantuvieron muy alejados del valor de seguridad proporcionado por el fabricante (-600 mbar), no fue necesaria la limpieza química en todo el periodo experimental.

El reactor mesófilo con la configuración AnMBR fue operado durante 2.5 años, a lo largo de los cuales las condiciones operacionales se fueron modificando con el fin de maximizar la producción de biogás. En base a dichas condiciones operacionales se pueden distinguir 5 periodos de estudio que se han denominado M-II, M-III, M-IV, M-V, M-VI, y cuyas principales características se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Condiciones operacionales establecidas en el reactor mesófilo para las dos configuraciones estudiadas.

Periodos	CSTR	AnMBR				
	M-I	M-II	M-III	M-IV	M-V	M-VI
TRC (días)	50	70	70	100	100	140
TRH (días)	50	50	15	15	15	15
OLR (g·d ⁻¹ ·L ⁻¹)	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4
Microalga predominante	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>
Membrana	NO	SI	SI	SI	SI	SI

En esta tabla, cabe destacar que el incremento de la OLR desde 0.2 hasta 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹, realizado del periodo M-II al M-III, se llevó a cabo modificando conjuntamente el TRH y la concentración de microalgas en el alimento, tal y como se explica posteriormente en la sección de resultados.

El criterio seguido para considerar que se ha alcanzado el estado estacionario en cada uno de los periodos fue la estabilidad en la concentración de sólidos en el reactor y la producción de biogás, así como la ausencia de acumulación en el balance de DQO y una desviación en dicho balance inferior al 10%.

3.3.2. Reactor termófilo

La degradación anaerobia de biomasa algal en condiciones termófilas fue llevada a cabo en un reactor CSTR, con un volumen total de 2 L y un espacio de cabeza de 0.4 L, cuyo esquema y vista general se muestran en la Figura 3.7.

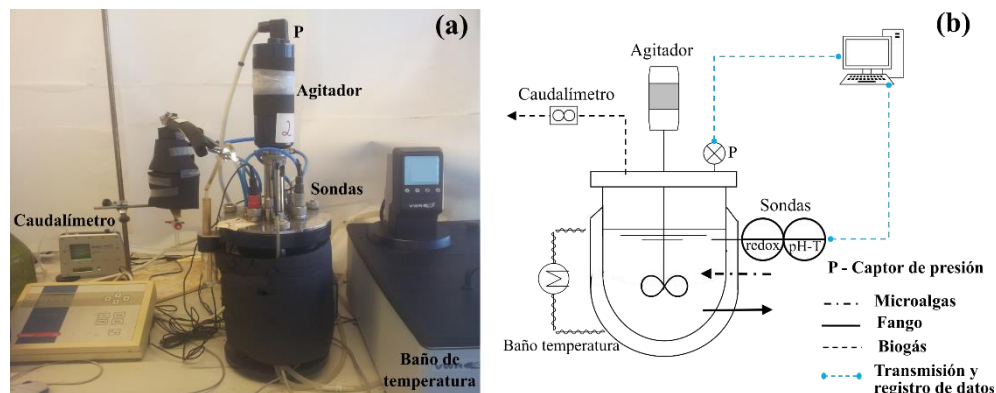


Figura 3.7. Vista general (a) y esquema (b) del reactor CSTR en condiciones termófilas.

Este reactor se inoculó con 1.6 L de fango termófilo y su purga y posterior alimentación de biomasa algal fresca se realizó diariamente. El fango empleado como inóculo fue suministrado por el Dr. Fernando Fernández-Polanco, catedrático de la Universidad de Valladolid, y procedía de una planta piloto termófila en la que se digería el fango de una EDAR situada en Valladolid (España). La agitación se llevó a cabo de forma mecánica, la temperatura de operación se mantuvo en 55°C y no hubo recirculación de la biomasa, por lo que el TRH y el TRC fueron equivalentes durante toda la experimentación. El CSTR termófilo fue operado durante dos años, los cuales pueden dividirse en 6 periodos denominados T-I, T-II, T-III, T-IV, T-V y T-VI. Las condiciones operacionales establecidas en cada periodo se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones operacionales establecidas en cada periodo experimental estudiado en el reactor CSTR termófilo.

Periodos	T-I	T-II	T-III	T-IV	T-V	T-VI
TRC (días)	50	50	50	70	35	35
TRH (días)	50	50	50	70	35	35
OLR (g·d ⁻¹ ·L ⁻¹)	0.2	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4-1.0
Microalga (spp.) predominante	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i>

De la misma forma que en el reactor mesófilo, se consideró que se había alcanzado el estado estacionario en cada uno de los periodos cuando la concentración de sólidos en el reactor y la producción de biogás exhibieron estabilidad, no se observó acumulación en el balance de DQO y la desviación en dicho balance fue inferior al 10%.

En el último periodo (T-VI), mostrado en la Tabla 3.4, se realizó un incremento progresivo de la carga (0.4, 0.6, 0.8, 0.9 y 1.0 g·L⁻¹·d⁻¹) para determinar si se producía la inhibición del sistema por amoníaco. Tras este periodo, se realizó un estudio en *batch* para tratar de cuantificar el porcentaje de inhibición de la actividad metanogénica (SMA – *Specific Methanogenic Activity*) a distintas concentraciones de amoníaco.

Para realizar este estudio de inhibición en *batch*, se utilizó el mismo equipo (AMPTS II, Bioprocess Control) que para los ensayos de pretratamiento (ver apartado 3.2). De la misma forma, se emplearon reactores con 500 mL de volumen total y 400 mL de volumen de trabajo, preparados con una relación inóculo-sustrato (I/S) de 0.5 gDQO·gSV⁻¹. En este caso, se utilizó como inóculo el fango del reactor CSTR termófilo y como sustrato una disolución de acetato de sodio con una concentración de 2000 mgDQO·L⁻¹, preparada en un medio de cultivo. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y junto a un blanco (medio de cultivo sin acetato de sodio).

El blanco se prepara con el fin de conocer la biodegradación de la materia orgánica procedente del propio fango y poder restarla al resultado de la SMA de los ensayos con acetato. El medio de cultivo empleado en estos ensayos consiste en una disolución de macronutrientes, micronutrientes y una solución tampón de fosfato, las cuales se preparan tal y como se indica en la Tabla 3.5. Para la preparación del medio de cultivo empleado en el blanco, se añaden 6 mL de la solución de macronutrientes por litro de medio, 0.6 mL de la solución de micronutrientes por litro de medio y 50 mL de solución tampón fosfato (30.5 mL del Buffer A y 19.5 mL del Buffer B) por litro de medio, empleando agua destilada para completar el volumen. El medio de cultivo empleado en el resto de muestras se prepara de igual forma y además se le añaden 4.25 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ por litro de medio.

Tabla 3.5. Concentraciones de las distintas soluciones empleadas para la preparación del medio de cultivo.

Tampón fosfato	
Buffer A: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.2 M
Buffer B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 M
Macronutrientes	
NH_4Cl	170 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Micronutrientes	
$\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
ZnCl_2	50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
HBO_3	50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	90 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
EDTA	1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
HCl 36%	1 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$
Resazurina	0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Extracto de levadura	2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de amoníaco sobre la SMA, se realizaron ensayos en paralelo en los que se incrementaba progresivamente la concentración de amonio con respecto a la concentración original en el fango. El amonio se incrementó añadiendo NH_4Cl , tal y como se muestra en la Tabla 3.6, calculándose el amoníaco presente en el sistema mediante la ecuación de equilibrio (ver 3.4.4, Pág. 114).

Tabla 3.6. Incremento de NH_4 en los distintos experimentos de inhibición de la actividad metanogénica.

Experimento	NH_4Cl (g)⁽¹⁾	Incremento de N-NH_4 (%)⁽²⁾
Control	-	0%
E1	0.0629	10%
E2	0.1387	20%
E3	0.1886	30%
E4	0.2774	40%
E5	0.3771	60%
E6	0.5028	80%
E7	0.6285	100%
E8	0.8171	130%

⁽¹⁾ gramos de NH_4Cl añadidos en los 400 mL de volumen de trabajo en cada botella. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado.

⁽²⁾ porcentaje de nitrógeno amoniacal (N- NH_4) incrementado, mediante la adición de NH_4Cl , con respecto a la concentración de N- NH_4 presente en el fango empleado como inóculo.

Una vez preparados los ensayos y previo a su inicio, las botellas fueron burbujeadas con N_2 con el fin de desplazar el oxígeno del espacio de cabeza y obtener un sistema anaerobio. Una vez iniciado el experimento, a 55°C de temperatura, el equipo AMPTS II registra la producción de metano en el tiempo, finalizándose el experimento en un periodo de tiempo de entre 3 y 7 días, y obteniéndose la máxima tasa de producción de metano por día mediante el cálculo de la pendiente, tal y como se muestra en la Figura 3.8.

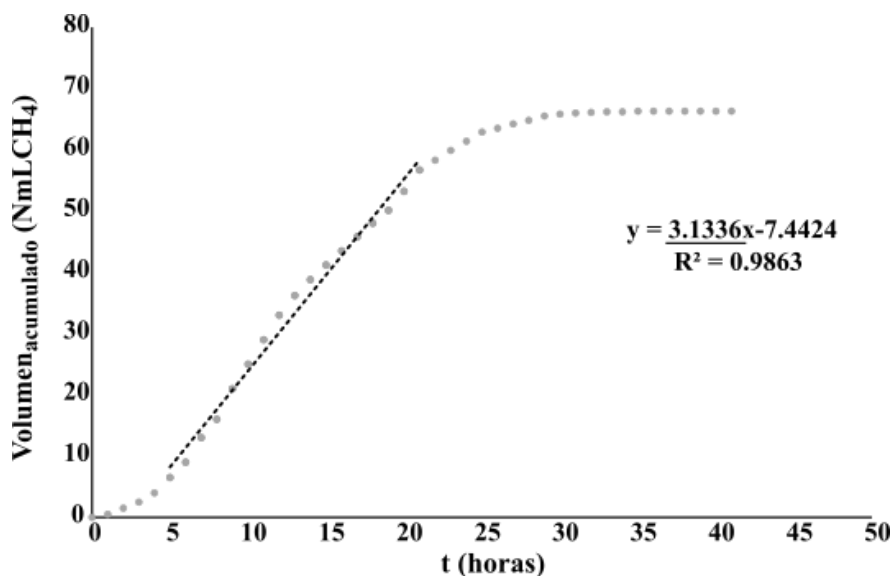


Figura 3.8. Ejemplo del cálculo de la tasa máxima de producción de metano en un ensayo de SMA.

El valor de la SMA se corresponderá con dicha pendiente dividida entre los gramos de SV del fango, una vez eliminada la tasa de producción de metano endógena obtenida del blanco (ensayo sin acetato).

3.4. Seguimiento de la estabilidad y eficiencia del proceso biológico

El seguimiento del proceso se realizó mediante el balance de DQO, el balance de sólidos volátiles y la producción de biogás, los cuales permiten evaluar el funcionamiento del sistema e identificar el estado pseudo-estacionario dentro de cada periodo experimental, entendiéndose por estado pseudo-estacionario aquel periodo de tiempo en el que los parámetros representativos del proceso biológico se mantienen constantes en un determinado rango (Molina et al., 2003). En concreto, la ausencia de DQO acumulada en el sistema al cerrar este balance y la ausencia de variaciones sustanciales en la concentración de sólidos en el reactor y en la producción de biogás, fueron considerados como los parámetros indicadores de la

estabilidad del proceso. El balance de sólidos proporciona información sobre la capacidad hidrolítica de la biomasa anaerobia y, por tanto, de la eficiencia del sistema para eliminar sólidos. De esta forma, dicha eficiencia de eliminación de sólidos junto con la eliminación de materia orgánica y el cálculo de la biodegradabilidad de la biomasa algal, han sido los parámetros empleados para evaluar el rendimiento del proceso anaerobio.

3.4.1. Balance de DQO

El balance de DQO aplicado al sistema CSTR, empleado en el periodo M-I y en todo el periodo experimental en condiciones termófilas, se corresponde con la siguiente ecuación:

$$Q_{\text{entrada}} \cdot \text{DQO}_{\text{entrada}} = Q_{\text{purga}} \cdot \text{DQO}_{\text{reactor}} + Q_{\text{CH}_4}^{\text{biogás}} + Q_{\text{purga}} \cdot \text{DQO}_{\text{S}^{-2}} + \text{DQO}_{\text{acumulada}} \cdot V_{\text{reactor}} \quad [\text{Ec. 3.3}]$$

dónde Q_{entrada} ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$) es el caudal alimentado al reactor y $\text{DQO}_{\text{entrada}}$ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es la DQO de las microalgas en el alimento; Q_{purga} ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$) es el caudal purgado directamente del reactor, el cual es igual al caudal de entrada, y $\text{DQO}_{\text{reactor}}$ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es el valor de DQO en el reactor; $Q_{\text{CH}_4}^{\text{biogás}}$ ($\text{mg DQO} \cdot \text{d}^{-1}$) se corresponde con el caudal másico de metano producido en la corriente de biogás medido como DQO; $\text{DQO}_{\text{S}^{-2}}$ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es la DQO consumida en la reducción del sulfato por parte de las SRB. El último término representa la acumulación de materia orgánica en el reactor, siendo V_{reactor} (L) el volumen de fango en el reactor y $\text{DQO}_{\text{acumulada}}$ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) la diferencia entre las concentraciones de DQO al principio y al final del pseudo-estado estacionario.

Para poder aplicar este balance al sistema AnMBR, se debe tener en cuenta que no solo existen las corrientes de alimentación, purga y producción de biogás, sino que también existe un efluente o permeado que debe ser incluido en la ecuación. De esta

forma, el balance de materia en un AnMBR se corresponde con la siguiente expresión (Giménez, 2014):

$$Q_{\text{entrada}} \cdot DQO_{\text{entrada}} = Q_{\text{purga}} \cdot DQO_{\text{reactor}} + Q_{\text{CH}_4^{\text{biogás}}} + DQO_{\text{acumulada}} \cdot V_{\text{reactor}} + Q_{\text{permeado}} \cdot DQO_{\text{residual}} + Q_{\text{permeado}} \cdot DQO_{\text{CH}_4^{\text{disuelto}}} + Q_{\text{permeado}} \cdot DQO_{\text{S}^{-2}} \quad [\text{Ec. 3.4}]$$

En esta ecuación (Ec. 3.4), los tres últimos términos corresponden al efluente del AnMBR, donde Q_{permeado} ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$) es el caudal de permeado obtenido tras el proceso de filtración con membrana; DQO_{residual} ($\text{mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es la DQO soluble que el proceso no ha sido capaz de eliminar; $DQO_{\text{CH}_4^{\text{disuelto}}}$ ($\text{mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es la DQO correspondiente al metano disuelto en el permeado; $DQO_{\text{S}^{-2}}$ ($\text{mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) es la DQO correspondiente al sulfuro presente en el permeado como resultado de la reducción del sulfato por parte de las SRB.

El uso de un sistema de separación física basado en membranas de ultrafiltración genera un efluente libre de sólidos, por lo que la DQO total de este efluente vendrá dada por la suma de la DQO_{residual} , $DQO_{\text{CH}_4^{\text{disuelto}}}$ y la $DQO_{\text{S}^{-2}}$. La DQO total presentó bajos valores a lo largo de toda la experimentación, por lo que las distintas fracciones solubles suponen un elevado porcentaje de la misma y deben ser consideradas. Estas fracciones de la DQO son determinadas de la siguiente forma:

- **Metano disuelto ($DQO_{\text{CH}_4^{\text{disuelto}}}$).** La determinación del metano disuelto es importante tanto para conocer su aportación a la DQO total del efluente como para poder cuantificar el metano total producido durante el proceso anaerobio. Esta determinación se llevó a cabo aplicando la ley de equilibrio de Henry (Ec. 3.5), tal como fue previamente descrito por Giménez et al. (2012). De esta forma, conociendo la fracción molar de metano en el biogás (y_{CH_4}), se puede conocer su fracción molar en el líquido (x_{CH_4}) para una presión (P en atm) y temperatura (T en Kelvin) dadas.

$$P \cdot y_{\text{CH}_4} = H_{\text{CH}_4}(T) \cdot x_{\text{CH}_4} \quad [\text{Ec. 3.5}]$$

En esta ecuación, H_{CH_4} es la constante de Henry para el metano, la cual es función de la temperatura del sistema (T en Kelvin), y viene dada por la siguiente ecuación (Tchobanoglous et al., 2003):

$$H_{\text{CH}_4}(T) = 10^{\left(\frac{-675.76}{T} + 6.88\right)} \quad [\text{Ec. 3.6}]$$

Una vez conocida la fracción molar del metano en la fase líquida y sabiendo que la molaridad del agua ($M_{\text{H}_2\text{O}}$) es de $55.56 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pueden obtenerse los moles de metano en la fase líquida (M_{CH_4}) aplicando la siguiente ecuación:

$$x_{\text{CH}_4} = \frac{M_{\text{CH}_4}}{M_{\text{CH}_4} + M_{\text{H}_2\text{O}}} \quad [\text{Ec. 3.7}]$$

De esta forma, sabiendo que 1 mol de metano requiere de 64 g de O_2 para su completa oxidación, la concentración de metano disuelto en términos de DQO puede ser calculada como:

$$[\text{CH}_4]_{\text{disuelto}} = M_{\text{CH}_4} \cdot \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \frac{64 \text{ g}}{\text{mol}} \cdot \frac{1000 \text{ mg}}{\text{g}} \right) \quad [\text{Ec. 3.8}]$$

- **Sulfuros en el permeado ($\text{DQO}_{\text{S}^{-2}}$).** Los sulfuros interfieren en la determinación de la DQO puesto que éstos son completamente oxidados durante su análisis (APHA, 2012). Por ello, para llevar a cabo la estimación de la DQO asociada a los sulfuros presentes y poder corregir así el valor de la DQO del efluente, puede considerarse que se produce una oxidación total desde S^{-2} hasta SO_4^{-2} . De esta forma, la oxidación estequiométrica de los sulfuros da lugar a un consumo de 2 moles de O_2 por cada mol de S^{-2} . El

valor de los sulfuros puede obtenerse mediante su medición directa por espectrofotometría o como el resultado de la siguiente expresión:

$$[S^{-2}]_{\text{permeado}} = [S-SO_4]_{\text{alimento}} - [S-SO_4]_{\text{permeado}} \quad [\text{Ec. 3.9}]$$

- **DQO no degradada (DQO_{residual}).** La DQO residual está formada por la fracción soluble fácilmente fermentable (S_F), la DQO de los AGV presentes en el permeado (S_A) y la fracción soluble inerte (S_I). Debido a que las fracciones S_F y S_I no pueden ser determinadas analíticamente, el valor de la DQO_{residual} se determinará como la DQO total del efluente menos los valores de DQO_{CH₄}^{disuelto} y DQO_{S-2}.

El balance de DQO se considera cerrado cuando el porcentaje de error entre el término de DQO de entrada ($g \cdot d^{-1}$) y la suma de los términos que representan la DQO de salida ($g \cdot d^{-1}$) es inferior al 10%, calculándose dicho error mediante la siguiente ecuación:

$$\%Error_{\text{Balance}} = \frac{DQO_{\text{entrada}} - DQO_{\text{salida}}}{DQO_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [3.10]$$

Así mismo, se considera que el proceso ha alcanzado el estado pseudo-estacionario cuando la DQO acumulada ($g \cdot d^{-1}$) en el reactor es nula, considerándose como tal cuando no representa más de un 5% de la DQO de entrada ($g \cdot d^{-1}$). El porcentaje de DQO acumulada se calcula mediante la ecuación mostrada a continuación:

$$\%DQO_{\text{Acumulada}} = \frac{DQO_{\text{acumulada}}}{DQO_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [3.11]$$

3.4.2. Balance de sólidos volátiles

A diferencia del balance de la DQO, el balance de sólidos aplicado a un sistema CSTR es el mismo que a un sistema AnMBR dado que el permeado de este último reactor se encuentra libre de sólidos. Por lo tanto, el balance de sólidos puede expresarse de la siguiente forma (Giménez, 2014):

$$Q_{\text{entrada}} \cdot SV_{\text{entrada}} = Q_{\text{purga}} \cdot SV_{\text{reactor}} + V_{\text{reactor}} \cdot SV_{\text{acumulados}} \quad [\text{Ec. 3.12}]$$

donde Q_{entrada} ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$) es el caudal influente al reactor, SV_{entrada} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) son los sólidos volátiles de las microalgas alimentadas, Q_{purga} ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$) es el caudal purgado, SV_{reactor} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) son los sólidos volátiles del fango, V_{reactor} (L) es el volumen de fango en el reactor y $SV_{\text{acumulados}}$ ($\text{mg SV} \cdot \text{L}^{-1}$) es la diferencia entre la concentración de sólidos volátiles del fango al inicio y al final del pseudo-estado estacionario establecido para cada periodo experimental.

3.4.3. Eficiencia del proceso

Una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, la eficiencia del proceso fue evaluada en términos de porcentaje de eliminación de DQO (Ec. 3.13), porcentaje de sólidos volátiles eliminados (Ec. 3.14) y porcentaje de biodegradabilidad (Ec. 3.15), tal y como se muestra a continuación:

$$\%DQO_{\text{eliminada}} = \frac{(DQO_{\text{entrada}} - DQO_{\text{salida}})}{DQO_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 3.13}]$$

$$\%SV_{\text{eliminados}} = \frac{(SV_{\text{entrada}} - SV_{\text{salida}})}{SV_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 3.14}]$$

$$\%Biodegradabilidad = \frac{CH_4_{\text{producido}}}{CH_4_{\text{potencial}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 3.15}]$$

donde $DQO_{entrada}$ ($g \cdot d^{-1}$) es la DQO de las microalgas alimentadas, DQO_{salida} ($g \cdot d^{-1}$) es el efluente de los reactores correspondiente a la purga en la configuración CSTR y purga más permeado en la configuración AnMBR, $SV_{entrada}$ ($g \cdot d^{-1}$) son los sólidos volátiles de las microalgas alimentadas y SV_{salida} ($g \cdot d^{-1}$) son los sólidos volátiles en la corriente de purga. En cuanto a la biodegradabilidad, ésta se ha calculado como el porcentaje de la materia orgánica que entra al digestor (medida como DQO) que es degradada y transformada en metano. La expresión para el cálculo de la biodegradabilidad (Ec 3.15) se deriva del balance de DQO al digestor (Ec. 3.3, pág. 109 y Ec. 3.4, pág. 110), en el que la DQO que entra al digestor, o bien se acumula en el digestor, o bien sale en forma de metano o en forma de DQO sin degradar con la salida/purga. Para cuantificar la DQO que se ha transformado en metano, se ha dividido la cantidad de metano registrada ($CH_{4producido}$, mL) por el ratio $350 \text{ ml } CH_4 \cdot gDQO^{-1}$ (Ec. 3.1, Pág. 96) que representa el término $CH_{4potencial}$ (mL).

3.4.4. Amoniac

La presencia de elevadas concentraciones de amonio en los sistemas anaerobios puede dar lugar a la inhibición del proceso biológico. Por ello, conocer su concentración en los reactores permite evaluar su funcionamiento y correlacionar la evolución de distintos parámetros como la actividad metanogénica, la producción de biogás y la acumulación de AGV en el reactor. La concentración de amoniac se puede calcular a partir de la ecuación de equilibrio, la cual depende de la concentración total de nitrógeno amoniacal (TAN – *Total Ammonia Nitrogen*) en el medio (Ec. 3.16), el pH y la temperatura. Así pues, según la reacción de equilibrio de NH_4^+/NH_3 , la constante de equilibrio puede expresarse como la relación entre las concentraciones de los reactivos y los productos, tal y como se muestra en la ecuación 3.17:

$$TAN = NH_4^+ + NH_3 \quad [Ec. 3.16]$$

$$\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+$$
$$K(T) = \frac{[\text{NH}_3] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]} \quad [\text{Ec. 3.17}]$$

donde K es la constante de equilibrio, la cual es dependiente de la temperatura (T en Kelvin), $[\text{NH}_4^+]$ es la concentración de amonio en el medio, $[\text{H}^+]$ es la concentración de protones en el medio, la cual puede ser conocida a partir del pH, y $[\text{NH}_3]$ es la concentración de amoníaco que se desea conocer. La combinación de las ecuaciones 3.16 y 3.17 da lugar a la siguiente expresión matemática, empleada para el cálculo de la concentración de amoníaco en el reactor (Zhang et al., 2012):

$$[\text{NH}_3] = \frac{\text{TAN}}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-(0.09018 + 2729.92/T)}}} \quad [\text{Ec. 3.18}]$$

3.5. Procedimientos analíticos

La descripción detallada de todos los métodos analíticos mencionados a continuación se encuentra en el apartado 7.2 (pág. 280), del capítulo nombrado como **Anexo**.

3.5.1. Determinación de la demanda química de oxígeno

La materia orgánica presente en las muestras se determinó mediante el análisis de la demanda química de oxígeno (DQO) descrito en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), siendo su valor empleado para realizar el balance de DQO y calcular el rendimiento del proceso en términos de porcentaje de DQO eliminada. El método para la determinación de la DQO se seleccionó en base a la concentración esperada y la presencia de sólidos de la muestra a analizar, empleando el método 5220-B para el análisis de DQO total de la muestra y el método 5220-C para en análisis de la DQO soluble.

3.5.2. Determinación de sólidos

La medida de los sólidos se realizó para llevar a cabo el seguimiento del proceso, así como para evaluar su rendimiento en términos de porcentaje de sólidos eliminados. La determinación de los sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos totales (SST) se realizó mediante los métodos 2540-B y 2540-D (PAHA, 2012), respectivamente, mientras que los sólidos volátiles (SV) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinaron según el método 2540-E (APHA, 2012).

3.5.3. Determinación de nutrientes

La medida de los nutrientes en las distintas corrientes se realizó para evaluar el funcionamiento del proceso, pues permite conocer su porcentaje de solubilización como consecuencia de la mineralización de nitrógeno y fósforo por parte de los microorganismos anaerobios. La determinación del nitrógeno total (N_T) y del nitrógeno soluble (N_S) se llevó a cabo por el método DIN EN ISO 11905-1, el amonio se determinó por el método 4500-NH₃-G (APHA, 2012), el análisis del fósforo total (P_T) se realizó por los métodos 4500-P-B y 4500-P-F, ya que requiere de una previa digestión ácida de la muestra para su determinación, y los ortofosfatos se determinaron según el método 4500-P-F (APHA, 2012).

También se determinó la concentración de sulfatos mediante el método 4500-SO₄²⁻-F (APHA, 2012), con el fin de conocer la DQO consumida por las bacterias sulfato-reductoras, pues constituye un término del balance de materia.

3.5.4. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad

La medida de los ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) y de la alcalinidad (ALK) es fundamental para seguir el funcionamiento del proceso biológico puesto que son claros indicadores de la estabilidad del mismo. La determinación de ambos parámetros se llevó a cabo mediante el método de valoración ácido-base a 5 puntos, propuesto por Moosbrugger et al. (1992).

3.6. Análisis de las poblaciones microbianas

La caracterización de la comunidad microbiana capaz de llevar a cabo la digestión anaerobia de microalgas de forma estable, permite conocer los microorganismos cuya actividad hidrolítica les permite degradar la resistente pared celular que presentan las microalgas que crecen espontáneamente en agua residual, proporcionando así una importante información sobre el proceso biológico.

El estudio de las poblaciones microbianas involucradas en la degradación anaerobia de microalgas se desarrolló en la *Norwegian University of Life Sciences* (NMBU, Noruega), bajo la supervisión del Dr. Svein Jarle Horn, responsable del grupo de investigación *Bioprocess Technology and Biorefining* (BTB), durante la estancia doctoral financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del Subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI).

Este estudio se llevó a cabo en el periodo M-IV (Tabla 3.3, pág. 102), donde el AnMBR mesófilo alcanzó una elevada biodegradabilidad de la biomasa algal, y el periodo T-V (Tabla 3.4, pág. 104) en el que el CSTR termófilo se operó bajo condiciones que mantuvieran al proceso alejado de una posible inhibición por NH_3 . Así mismo, dado que el cultivo de microalgas no es puro, se analizó la población procariota presente en el alimento con el fin de comprobar su influencia en la comunidad microbiana desarrollada en los reactores.

Para llevar a cabo este estudio, 5 muestras de ambos reactores fueron tomadas a lo largo del estado pseudo-estacionario, con una periodicidad semanal, y 4 muestras del alimento fueron analizadas durante el mismo periodo de tiempo. Las muestras del reactor mesófilo fueron cogidas los días 534, 543, 551, 563, 571 y las del reactor termófilo los días 709, 717, 724, 735, 745 de experimentación. Las muestras procedentes del alimento fueron tomadas simultáneamente a las muestras de los reactores. Sin embargo, éstas pertenecieron al mismo *batch* de biomasa algal concentrada, por lo que pueden considerarse como réplicas técnicas. Todas las

muestras fueron inmediatamente congeladas a -20°C tras su toma y almacenadas a esta temperatura hasta su análisis genómico mediante secuenciación masiva o NGS (*Next-Generation Sequencing*), usando el secuenciador Illumina MiSeq.

Generalmente, este análisis se realiza mediante la amplificación y secuenciación de regiones variables del gen ARNr 16S, puesto que este gen es altamente conservado en todos los procariotas. La longitud del gen es aproximadamente de 1550 pb (pares de bases), lo que dificulta su completa secuenciación. Por ello, normalmente se selecciona una o varias de las nueve regiones variables (V) que lo componen para su análisis, siendo la mayoría de archaeas y bacterias detectadas en la región V4 (Di Bella et al., 2013). Para llevar a cabo la secuenciación se necesita tener una gran cantidad de copias del segmento que se desea secuenciar, por lo que éste se amplifica mediante una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) previa a la secuenciación. La PCR es una reacción en cadena que replica las hebras de ADN mediante la enzima ADN polimerasa, siendo esta reacción iniciada por un *primer* o iniciador. Este *primer* consiste en una serie de nucleótidos complementarios a la región del gen ARNr 16S que se desea amplificar, siendo comúnmente necesarios dos *primers* para definir los extremos de esta región. Los *primers* actúan como punto de inicio para que la ADN polimerasa comience la adición de nucleótidos y se replique así el ADN. Una vez obtenidos los amplicones (productos de la PCR), éstos son secuenciados haciendo uso de un secuenciador, en este caso Illumina MiSeq. Este secuenciador utiliza una tecnología de secuenciación por síntesis que emplea nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia. La fluorescencia que emiten estos nucleótidos al ser excitados es detectada por el equipo, determinando así la composición de la hebra de ADN (Cabezas et al., 2015).

Las secuencias obtenidas reciben un tratamiento bioinformático en el que se evalúa su calidad y son alineadas y agrupadas en OTUs (*Operational Taxonomic Units*), definiéndose OTU como la agrupación de secuencias que presentan un elevado porcentaje de similitud, generalmente establecido en un 97%. Tras la agrupación de

las secuencias en OTUs, se determina de qué microorganismos provienen mediante su comparación con bases de datos de secuencias conocidas (Di Bella et al., 2013).

En la presente tesis, el procedimiento seguido para el análisis genómico de las muestras de los reactores y el alimento es el que se detalla a continuación.

3.6.1. Extracción de ADN de las muestras

La extracción de ADN fue realizada a partir de 1 mL de muestra, la cual fue centrifugada a 10000 $\times g$ durante 5 minutos con el fin de poder eliminar la fracción líquida de la misma. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 300 μL de buffer S.T.A.R. (Roche Molecular Systems, Inc.) para estabilizar los ácidos nucleicos en la muestra. La disrupción celular se llevó a cabo añadiendo a la muestra 0.25 g de microperlas de vidrio lavadas al ácido y sometiéndola a dos pulsaciones de 20 segundos a 6500 rpm cada una, mediante un equipo MagNaLyser (Roche Molecular Systems, Inc.). Una vez realizada la disrupción celular, la muestra se centrifugó a 13000 $\times g$ durante 5 minutos para facilitar la recuperación del ADN del sobrenadante. Seguidamente, el ADN fue extraído mediante el kit MagMidi (LGC Genomics), empleando un robot KingFisherTM Flex (Thermo Scientific), de acuerdo con el procedimiento proporcionado por el fabricante. La concentración de ADN se midió mediante un fluorímetro Qubit, con el kit de ensayo Quant-iT dsDNA Br (Invitrogen, USA), y la pureza del ADN se comprobó con un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific).

3.6.2. Amplificación y secuenciación del ADN

El ADN extraído de las muestras fue amplificado con los *primers* Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') y Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') (Takahashi et al., 2014), los cuales actúan sobre las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S de bacterias y archaeas. La amplificación se realizó mediante una PCR, cuya mezcla de reacción (25 μL) se

compuso de 2.5 µL de ADN (5 ng/µL), 12.5 µL de iProof HF Master Mix (BIO-RAD, USA) y 5 µL de cada primer (1 µM). El ciclo de la PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 98°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos constituidos cada uno de ellos por 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, finalizando con una etapa de elongación a 72°C durante 5 minutos. Los productos de la PCR fueron verificados mediante electroforesis, empleando un gel de agarosa al 1%. Las muestras amplificadas fueron marcadas mediante el kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina) según el procedimiento suministrado por el fabricante. Una vez codificados los amplicones, su concentración fue determinada de nuevo con el fluorímetro Qubit, haciendo uso del kit de ensayo Quant-iT dsDNA Br (Invitrogen, USA), y posteriormente ajustada a una concentración equimolar empleando el procedimiento 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation suministrado por Illumina. La secuenciación se realizó con el secuenciador Illumina MiSeq, empleando el kit de reactivos MiSeq v3 (600-ciclos) y siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

3.6.3. Tratamiento bioinformático de las secuencias

Los datos de secuencias obtenidos de las muestras se analizaron con una serie de programas. En primer lugar, las lecturas *paired-end* de cada muestra son ensambladas usando el programa PEAR (Zhang et al., 2014) y posteriormente filtradas mediante PRINSEQ (Schmieder and Edwards, 2011) con un índice de calidad medio de 30 y una longitud mínima de 350 pb. Los *primers* fueron eliminados usando la función *trim.seqs* del programa Mothur (Schloss et al., 2009). Finalmente, se eliminaron los posibles productos híbridos entre múltiples secuencias que pueden dar lugar a la identificación errónea de nuevos microorganismos (quimeras), y las secuencias resultantes de todo el proceso se agruparon en OTUs con un mínimo de similitud de secuencia del 97% (OTU_{0.97}) mediante USEARCH (Edgar, 2010; Edgar et al., 2011), el cual está implementado en el paquete de software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) v. 1.9.1 (Caporaso

et al., 2010), empleando Greengenes *gg_13_8* como base de datos para la identificación de microorganismos (McDonald et al., 2012).

3.6.4. Biodiversidad y análisis estadístico

La diversidad microbiana se evaluó en términos de alfa y beta diversidad. La alfa-diversidad representa la diversidad intrínseca de cada tipo de muestra, es decir, la riqueza de especies en un hábitat, mientras que la beta-diversidad se define como la tasa de reemplazo de especies entre hábitats, representando la diferencia de composición microbiana entre los distintos tipos de muestras (reactor AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y las microalgas). Para ello, se llevó a cabo el cálculo de los índices de diversidad de Simpson, Shannon, Gini y el número de especies observadas, así como la representación gráfica de las curvas de rarefacción para poder comparar la diversidad en las distintas muestras, el análisis de PCoA (*Principal Coordinate Analysis*) y PCA (*Principal Components Analysis*), y el test estadístico multiparamétrico ANOSIM.

Índices de diversidad

Estos índices se emplean para explicar tanto la riqueza de especies, en términos de número de especies por número de individuos, como para explicar la equitabilidad, la cual se define como la igualdad de distribución de los individuos en las distintas especies. En base a estos dos criterios, una muestra será más diversa cuanto mayor número de especies posea y mayor sea su uniformidad, lo cual puede ser evaluado mediante los siguientes índices, todo ellos calculados mediante QIIME (Caporaso et al., 2010):

- *Número de especies observadas (S_{obs})*: Número total de especies obtenido por un censo de la comunidad microbiana (número de individuos).
- *Índice de Simpson (D)*: Expresa la probabilidad de extraer al azar de una comunidad microbiana, dos individuos que sean de distinta especie. Este

índice es una medida de la dominancia, donde las especies comunes tiene mucho peso frente a las raras, y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad [3.19]$$

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad [3.20]$$

donde n_i es el número de secuencias de la especie i , N es el número de secuencias totales y S es el número de especies. Dado que este índice mide la homogeneidad de la muestra, su valor variará desde 0 para la máxima diversidad de especie, hasta 1 para muestras en las que su abundancia total esté dominada por una especie.

- *Índice de Shannon (H')*: Expresa tanto la riqueza en especies como su abundancia mediante la medida del grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una muestra, haciendo uso de la siguiente expresión:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i \quad [3.21]$$

donde S es el número de especies y p_i viene definido por la ecuación 3.20. El valor de este índice varía entre 0, cuando solo existe una especie en la muestra y $\ln S$, de forma que cuanto mayor es el índice, mayor es la diversidad.

- *Índice de Gini (G)*: Expresa la medida de desigualdad de distribución en una comunidad microbiana, siendo su significado opuesto al expresado por el índice de Simpson (D) y, por tanto, calculándose como $1-D$. Así pues, el valor de este índice variará desde 0, cuando solo existe una especie en la

muestra y consecuentemente es toda igual, hasta 1, valor que representa la máxima diversidad.

Métodos para la interpretación y comparación de los datos

Las técnicas empleadas para el análisis de los resultados parten todas ellas de la matriz de datos, en la cual las muestras se disponen en columnas y los microorganismos identificados en filas, representados por su abundancia relativa en cada muestra. Sin embargo, la mayoría de análisis requieren de la transformación de esta matriz en una matriz de distancias entre muestras en función de su disimilitud. Estas distancias se calculan entre cada par de muestras y los valores obtenidos se sitúan normalmente en una matriz simétrica donde las muestras, numeradas de 1 hasta n , se disponen tanto en las filas como en las columnas. Por lo tanto, se obtendrá una matriz triangular de $n \cdot (n-1)/2$ donde la diagonal estará compuesta por ceros, ya que el valor 0 se corresponde con pares de muestras exactamente iguales. En la presente tesis se han utilizado las distancias UniFrac ponderadas y las distancias euclidianas para obtener la matriz de distancias, en función del análisis de los datos a realizar, las cuales se explican a continuación:

UniFrac (*Unique Fraction*) es una distancia métrica utilizada para comparar comunidades biológicas que considera tanto la abundancia de secuencias como la semejanza entre ellas, mediante la incorporación de las distancias filogenéticas entre organismos observados en el cálculo. Este cálculo se basa en construir un árbol filogenético con los organismos que se encuentran en cada par de muestras, marcar cada rama principal del árbol compartida entre muestras como “*compartida*” y las ramas que aparecen en una única muestra como “*no compartida*”, de forma que la distancia entre dos muestras será la fracción de la longitud total de rama que no es compartida. Las distancias UniFrac ponderadas contabilizan directamente las diferencias en las abundancias relativas (Lozupone and Knight, 2005; Lozupone et al., 2011).

La **distancia euclidiana** representa la distancia entre dos puntos en el espacio. En el contexto de la matriz de abundancias relativas de especies, esta distancia (d) entre las muestras j y k puede calcularse según la siguiente ecuación (Clarke and Warwick, 2001):

$$d_{jk} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (y_{ij} - y_{ik})^2} \quad [3.22]$$

donde y_{ij} representa el valor correspondiente a la intersección de fila i y la columna j de la matriz de datos.

A continuación se detallan los análisis de los datos de secuenciación realizados:

- *Curvas de rarefacción*: La rarefacción es un método que permite comparar el número de especies cuando las muestras no tienen el mismo tamaño, es decir, el mismo número de secuencias por muestra, estimando la riqueza de especies en función del tamaño de muestra más pequeño (Kraker-Castañeda and Cobar-Carranza, 2011). Mediante este método se puede realizar una representación gráfica del número de OTUs en el eje de las abscisas (x), frente al número de secuencias en el eje de las ordenadas (y) para las distintas muestras, a partir de la matriz de datos de abundancias. Esta representación da lugar a una curva que indica la diversidad de la muestra, de forma que cuanto mayor pendiente inicial tenga y mayor altura alcance la curva, más diversa será la muestra. Así mismo, si la curva tiende a la horizontalidad, indicará que la mayoría de los microorganismos presentes en la muestra han sido identificados, siendo la profundidad de la secuenciación suficiente para su caracterización microbiológica. En concreto, en este estudio se realizaron las curvas de rarefacción mediante el paquete de software QIIME (Caporaso et al., 2010), con un tamaño mínimo de 16500 secuencias por muestra.

- *PCA*: Método de extracción de la información contenida en una matriz de datos, realizado a partir de la matriz de distancias euclidianas, cuyo objetivo es producir una ordenación de las observaciones en un pequeño número de dimensiones, las cuales explican la mayor cantidad de variación original. Este análisis da lugar a un gráfico donde los puntos representan las muestras y las distancias se corresponden con la disimilitud entre la composición de dichas muestras. A su vez, en este gráfico, la componente principal 1 (PC1) se define como la dirección en la que la varianza de las muestras, proyectadas perpendicularmente al eje de abscisas, es maximizada y, por tanto, explica las mayores diferencias entre las muestras; mientras que la componente principal 2 (PC2) tiene la misma definición que la PC1 pero en este caso, las muestras se proyectan perpendicularmente al eje de ordenadas, explicando menores cambios que la PC1. En la presente tesis, este análisis se realizó para observar la similitud entre las muestras en base a las variables ambientales que las caracterizan, mediante el programa PAST (Hammer et al., 2001).
- *PCoA*: Método de ordenación de muestras mediante escalado multidimensional que permite visualizar la similitud o disimilitud entre las muestras, asignando a cada una de ellas una localización en un gráfico de dimensiones geométricas reducidas (2 o 3 dimensiones). Este análisis es conceptualmente similar al análisis de PCA pero, a diferencia del PCA, es realizado a partir de la matriz de distancias UniFrac, a la que se le aplica una transformación de escalado y centrado, facilitando el tratamiento de datos ecológicos complejos (Clarke and Warwick, 2001). En esta tesis, este análisis se ha utilizado para visualizar las similitudes o disimilitudes de muestras en base a la composición de las comunidades microbianas, con el fin de determinar los cambios en las poblaciones de microorganismos como consecuencia del tratamiento anaerobio de las microalgas bajo condiciones

mesófilas y termófilas. El análisis de PCoA fue realizado mediante QIIME (Caporaso et al., 2010).

- *ANOSIM (Analysis of similarities)*: El análisis de similitud es un test estadístico no paramétrico de variables múltiples que permite evaluar si las diferencias entre los grupos de muestras son significativas, en base a la composición de éstas (Anderson, 2008). Este test se realiza a partir de la matriz de distancias, la cual es transformada a una matriz de grado de distancia (o disimilitud) con el fin de disminuir la influencia de grandes diferencias en los valores de distancias, estableciendo un orden relativo. La conversión de distancias a su clasificación en grados de proximidad entre muestras, se realiza dando el valor “1” a la menor distancia, asignando valores crecientes a las distancias hasta completar la matriz de grados de distancia. En el caso de que haya distancias de igual valor, se les asigna el valor medio de los grados que ocupen. Por ejemplo, si en la matriz de distancias el valor “0” ocupa 3 posiciones, su grado de disimilitud se calcularía como $(1+2+3)/3$. Dado que la matriz de distancias es simétrica sobre su diagonal, solo uno de los lados será necesario. Para hacer el test ANOSIM se establece como hipótesis nula (H_0) que no hay diferencias entre las muestras de los distintos grupos (intergrupos), con un p-valor de 0.05, y se calcula el estadístico R para evaluar la similitud entre muestras mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\bar{r}_B - \bar{r}_w}{1/2 \cdot M} \quad [3.23]$$

$$M = n \cdot (n - 1) / 2 \quad [3.24]$$

donde \bar{r}_w es la media de todos los grados de similitud de las muestras dentro de un mismo grupo (intragrupos), \bar{r}_B es la media de los grados de similitud entre las muestras de los distintos grupos y n es el número total de muestras.

El estadístico R puede variar entre -1 y 1, de forma que $R = 1$ si todas las réplicas dentro de un mismo grupo son más similares entre ellas que cualquier réplica del resto de grupos, mostrando la completa separación de las muestras, $R = 0$ si la hipótesis nula es cierta y no hay diferencias entre ninguna de las réplicas, y $R = -1$ suele sugerir el error en el etiquetado de alguna muestra.

En esta tesis, test ANOSIM fue realizado a partir de la matriz de distancias ponderadas UniFrac, mediante el programa PAST (Hammer et al., 2001), con el fin de conocer si las diferencias de las composiciones microbianas del reactor mesófilo, el reactor termófilo y el alimento era significativamente distintas.

Los datos de las secuencias para las 14 muestras analizadas en este estudio fueron depositadas en el SRA (*Sequence Read Archive*) como parte del BioProyecto PRJNA324836, con números de acceso que abarcan desde el SRR5436370 hasta SRR5436383.

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1. Pretratamiento de la biomasa algal

Un gran porcentaje de las microalgas que crecen en el agua residual, tales como *Scenedesmus*, contienen una pared celular compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa que las hace resistentes a la degradación biológica (Fulke et al., 2013; Komolafe et al., 2014). Una de las vías para incrementar la biodegradabilidad de este tipo de biomasa es la aplicación de pretratamientos que consigan la rotura de dicha pared celular, de forma que se facilite su hidrólisis por parte de los microorganismos anaerobios (González-Fernández et al., 2015).

En la bibliografía se han encontrado numerosos estudios enfocados a incrementar la biodegradabilidad de estas microalgas, mediante la aplicación de distintos tipos de pretratamientos. De entre estos pretratamientos, el térmico ha sido el más ampliamente estudiado dado que es capaz de incrementar la biodegradabilidad de las microalgas con un menor coste energético que pretratamientos como la termohidrólisis, la termopresurización o los ultrasonidos (Passos et al., 2014b). Sin embargo, aunque el pretratamiento térmico aumenta la biodegradabilidad de la biomasa algal, el incremento de metano producido no compensa el coste energético requerido (González-Fernández et al., 2015). Alternativamente, los pretratamientos basados en potenciar la hidrólisis enzimática de la biomasa algal mediante la adición de enzimas sintéticas, son los que actualmente han mostrado mayores incrementos en la biodegradabilidad de microalgas (Passos et al., 2014b). Aunque este tipo de pretratamiento no ha sido estudiado con tanta profundidad como el tratamiento térmico, es el único del que se ha reportado un balance energético positivo (Ometto et al., 2014). Por ello, en la presente tesis, se decidió estudiar el efecto del pretratamiento enzimático sobre las microalgas procedentes de la planta piloto MPBR, las cuales estaban principalmente compuestas por el género *Scenedesmus*

spp. en ese momento, así como la influencia que tiene la variación de las condiciones experimentales del pretratamiento sobre la biometanización de esta biomasa algal. Así mismo, dada la importancia que tiene la actividad hidrolítica del propio fango para la degradación de este tipo de sustrato, previo al estudio de tratamiento enzimático se optó por realizar una selección del inóculo más adecuado para llevar a cabo la digestión anaerobia de las microalgas.

4.1.1. Influencia del inóculo en la biodegradabilidad

La biodegradabilidad anaerobia es una característica propia del sustrato que mide la tasa de conversión de sus componentes orgánicos a metano (Holliger et al., 2016). Sin embargo, la aclimatación del inóculo al sustrato que se pretende degradar es un factor a tener en cuenta, especialmente en sustratos que presentan elevada resistencia a la degradación anaerobia o en cuya degradación se liberen sustancias que inhiban el proceso biológico (Hussain and Dubey, 2015). Por esta razón, con el fin de estudiar la influencia del inóculo sobre la digestión anaerobia de *Scenedesmus*, se realizaron ensayos en *batch* mesófilos empleando tres inóculos: (i) inóculo procedente de la digestión mesófila convencional de los fangos producidos durante el tratamiento de aguas residuales en la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia, España), (ii) inóculo procedente de la planta piloto AnMBR psicrófila, en la que se lleva a cabo el tratamiento anaerobio conjunto de agua residual urbana (ARU) y la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), e (iii) inóculo procedente de un reactor AnMBR mesófilo a escala de laboratorio, adaptado a la digestión anaerobia de microalgas. Estos ensayos fueron realizados por duplicado y empleando como sustrato las mismas microalgas procedente de la planta piloto MPBR en cada uno de ellos, las cuales se caracterizaron por la predominancia del género *Scenedesmus* spp.

La Figura 4.1 muestra el volumen medio de metano producido por gramo de DQO de microalgas *Scenedesmus* spp. para los tres inóculos estudiados, una vez eliminado el volumen de metano correspondiente a la producción endógena, donde los porcentajes indican la biodegradabilidad de la biomasa algal en cada caso.

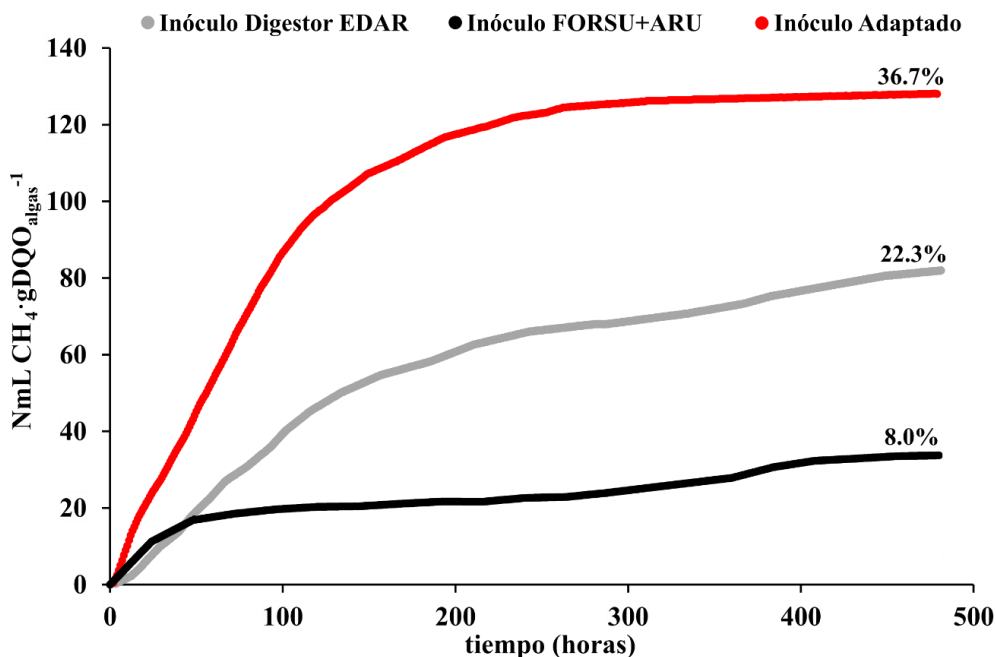


Figura 4.1. Volumen de metano producido por gramo de DQO de microalgas para los distintos inóculos estudiados. El valor sobre cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

En esta figura se demuestra que el inóculo tiene una influencia significativa en la degradación anaerobia de microalgas, para el periodo de tiempo estudiado. Como puede observarse, el fango procedente del tratamiento anaerobio de ARU y FORSU es el que menor capacidad de biodegradación de la biomasa algal presenta, puesto que solo alcanzó un valor de BMP de 28 mLCH₄·gDQO_{algas}⁻¹ (47 mLCH₄·gSV_{algas}⁻¹), correspondiente a una biodegradabilidad del 8.0%. Esto se debe principalmente a su baja actividad hidrolítica para los compuestos que contienen las microalgas, y a

que este inóculo procede de una digestión anaerobia en condiciones psicrófilas, por lo que los microorganismos no están adaptados a una temperatura de operación de 35°C. En cambio, el inóculo procedente del digestor convencional de EDAR exhibió un mayor potencial de biometanización que el fango adaptado al tratamiento anaerobio de ARU y FORSU, alcanzando un valor de BMP de $80 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{algas}}^{-1}$ ($150 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}_{\text{algas}}^{-1}$) correspondiente a una biodegradabilidad del 22.3%. Aunque este resultado es muy similar al reportado por otros estudios en los que se degradó anaeróbicamente *Scenedesmus* en *batch* a 35°C (González-Fernández et al., 2012a; Mussnug et al., 2010), pone de manifiesto que la actividad hidrolítica de este fango no es suficiente para obtener una adecuada biodegradación de las microalgas. Realizando la degradación anaerobia en *batch* de estas mismas microalgas con el fango procedente de la digestión anaerobia de biomasa algal en un AnMBR mesófilo, se obtuvo un valor de BMP de $128 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{algas}}^{-1}$ ($206 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}_{\text{algas}}^{-1}$), lo que supone un 36.7% de biodegradabilidad. Esta mayor biodegradabilidad alcanzada en el mismo intervalo de tiempo que el resto de ensayos denota la mayor actividad hidrolítica de este fango, lo cual se confirma con la elevada velocidad de producción de biogás desde el inicio del experimento ($0.858 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{algas}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) en comparación con las velocidades de 0.421 y $0.355 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{algas}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, obtenidas para el fango del digestor de EDAR y el fango del tratamiento anaerobio conjunto de ARU y FORSU, respectivamente.

En base a los resultados obtenidos en estos experimentos, se demuestra la importancia de seleccionar el inóculo en función de la adaptación de los microorganismos presentes a la temperatura de operación y al sustrato que se pretende degradar, seleccionándose el inóculo adaptado a la digestión anaerobia mesófila de microalgas para realizar el estudio de pretratamiento enzimático.

4.1.2. Hidrólisis enzimática

El pretratamiento de las microalgas *Scenedesmus* spp. mediante la adición de enzimas hidrolíticas (Viscozyme® L) se realizó en base a los resultados del estudio de hidrólisis enzimática realizado por Mahdy et al. (2014), quienes consiguieron incrementar la biodegradabilidad de las microalgas *Chlorella vulgaris* con un pretratamiento enzimático de 5 horas a 50°C, empleando una dosis de enzima de 0.3 mL·gST⁻¹ y un pH de 5.5.

Inicialmente, se procedió a evaluar esas mismas condiciones de pretratamiento sobre las microalgas *Scenedesmus* spp. A su vez, se comparó el efecto que tiene aplicar únicamente el tratamiento térmico de 50°C (pH = 5.5) durante 5 horas sobre la biodegradabilidad de la biomasa algal, así como el efecto de realizar el pretratamiento enzimático con un pH de 4.5, 6.5 y sin control de pH (pH libre), evaluándose la eficiencia del pretratamiento en términos de BMP y su correspondiente porcentaje de biodegradabilidad anaerobia de las microalgas.

En la Tabla 4.1 se resumen las condiciones y resultados de cada experimento de pretratamiento realizado a 50°C, cuyas producciones de metano normalizadas por gramo de DQO de microalgas se representan en la Figura 4.2. En esta figura, la nomenclatura de los ensayos (E1, E2, E3, E4 y E5) se corresponde con la descrita en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales y resultados promedio obtenidos de los ensayos de pretratamiento de *Scenedesmus* spp. a 50°C durante 5 horas.

Ensayo <i>batch</i>	T (°C)	Dosis (mL·gST ⁻¹)	pH	BMP (mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹)	BMP (mLCH ₄ ·gSV ⁻¹)	Biodegradabilidad (%)
E1	50	0.3	6.5	132	270	37.7
E2	50	0.3	libre	128	208	36.6
E3	50	0.3	4.5	132	270	37.7
E4 ⁽¹⁾	50	0.3	5.5	181	358	51.7
E5	50	0	5.5	133	275	38.0

⁽¹⁾ Condiciones experimentales del estudio de Mahdy et al. (2014).

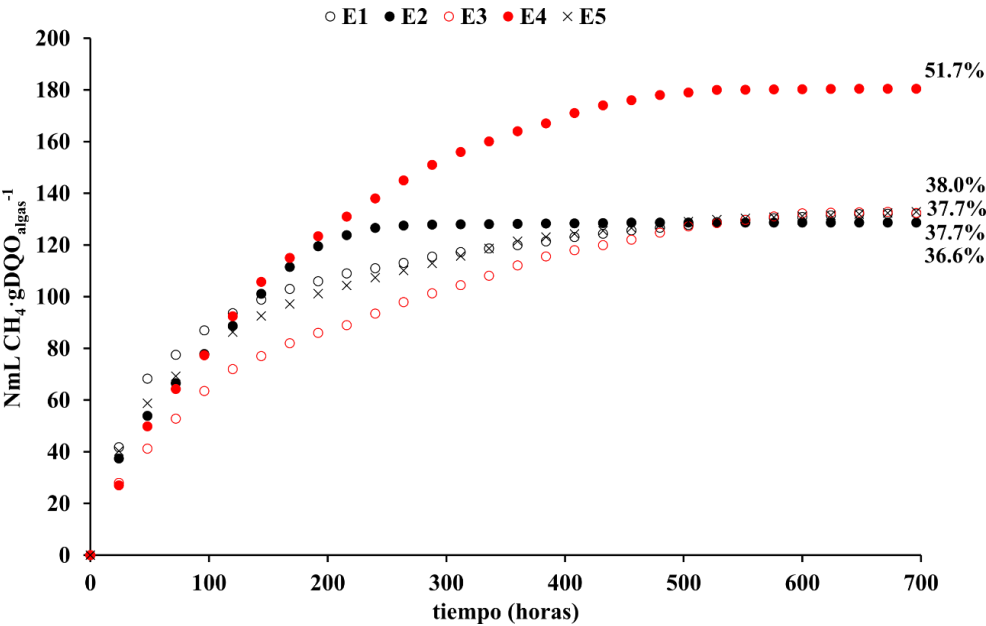


Figura 4.2. Producción de metano media por gramo de microalgas *Scenedesmus* spp. pretratadas. El valor junto a cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

Como puede verse en la Figura 4.2, el pretratamiento enzimático de *Scenedesmus* spp. que evidenció mejores resultados (E4) fue el realizado bajo las condiciones descritas por Mahdy et al. (2014), alcanzando un 51.7% de biodegradabilidad y una BMP de $181 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{algas}}^{-1}$ (Tabla 4.1). Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo fueron inferiores al 62.1% reportado por Mahdy et al. (2014) para el pretratamiento enzimático de *Chlorella vulgaris* con el mismo complejo de enzimas (Viscozyme® L), lo que evidencia la mayor resistencia de *Scenedesmus* spp. a la hidrólisis enzimática y la necesidad de optimizar el pretratamiento para cada cultivo de microalgas que se pretenda biometanizar. En cuanto al resto de ensayos enzimáticos realizados a 50°C, éstos no exhibieron un notable incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal en comparación con las microalgas sin pretratar utilizando un inóculo adaptado (Figura 4.2, Figura 4.1), lo que parece indicar que bajo esas condiciones de pretratamiento no se consigue dañar la pared celular de las microalgas. Así mismo, el pretratamiento térmico a 50°C y un pH de 5.5 durante 5 horas (E5) tampoco evidenció efecto alguno sobre la biodegradabilidad de las microalgas, lo cual demuestra que la mayor biodegradabilidad del ensayo E4 se debe a la hidrólisis enzimática y no al efecto individual del pH o la temperatura. A su vez, se corroboró la elevada resistencia de las microalgas pertenecientes al género *Scenedesmus* spp. dado que el efecto nulo del pretratamiento térmico coincide con estudios previos, en los que se determinó que para incrementar la biodegradabilidad de estas microalgas, se requiere un pretratamiento térmico a una temperatura mínima de 70°C (González-Fernández et al., 2012b; Mahdy et al., 2014a).

Estos resultados indican que la adecuada combinación de temperatura, pH y dosis de enzima consigue maximizar la biometanización de la biomasa algal mediante la adición de enzimas hidrolíticas sintéticas, y que las condiciones del pretratamiento deben ser optimizadas para cada sustrato que se pretende degradar.

Por ello, tras este estudio, se procedió a variar los parámetros de dosis, pH y temperatura alrededor de los valores estudiados en el experimento E4, con el fin de encontrar la combinación de los mismos que dé lugar a la máxima biodegradabilidad anaerobia de las microalgas *Scenedesmus* spp. Dichos parámetros se variaron según el diseño de experimentos ortogonal mostrado en la Tabla 3.1 (Pág. 93), y su eficacia se evaluó en términos de porcentaje de sólidos volátiles hidrolizados (%SV_{hidrolizados}) tras el pretratamiento y de BMP alcanzada junto con su correspondiente porcentaje de biodegradabilidad anaerobia de las microalgas.

En la Tabla 4.2 se muestran las condiciones experimentales de cada pretratamiento enzimático, los SV de la biomasa algal sin pretratar (Algas frescas), los SV de esta misma biomasa tras aplicar los pretratamientos y el porcentaje de SV hidrolizados que se alcanzó en cada caso, calculados según la ecuación 3.14 (Pág. 113). Los valores promedios de SV y %SV_{hidrolizados} se muestran en la Figura 4.3, donde la nomenclatura de los experimentos se corresponde con la descrita en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones experimentales de los pretratamientos, sólidos volátiles de la biomasa algal sin pretratar (Algas frescas) y SV tras el pretratamiento junto con su correspondiente porcentaje de sólidos hidrolizados.

	Dosis (mL·gST ⁻¹)	pH	T (°C)	SV (mg·L ⁻¹)	SV _{hidrolizados} (%)
Algas frescas	-	-	-	5780	-
N1	0.1	4.5	40	3674	36.4
N2	0.5	4.5	40	4068	29.6
N3	0.1	6.5	40	3612	37.5
N4	0.5	6.5	40	3916	32.2
N5	0.1	4.5	60	3738	35.3
N6	0.5	4.5	60	4094	29.2
N7	0.1	6.5	60	3484	39.7
N8	0.5	6.5	60	3872	33.0

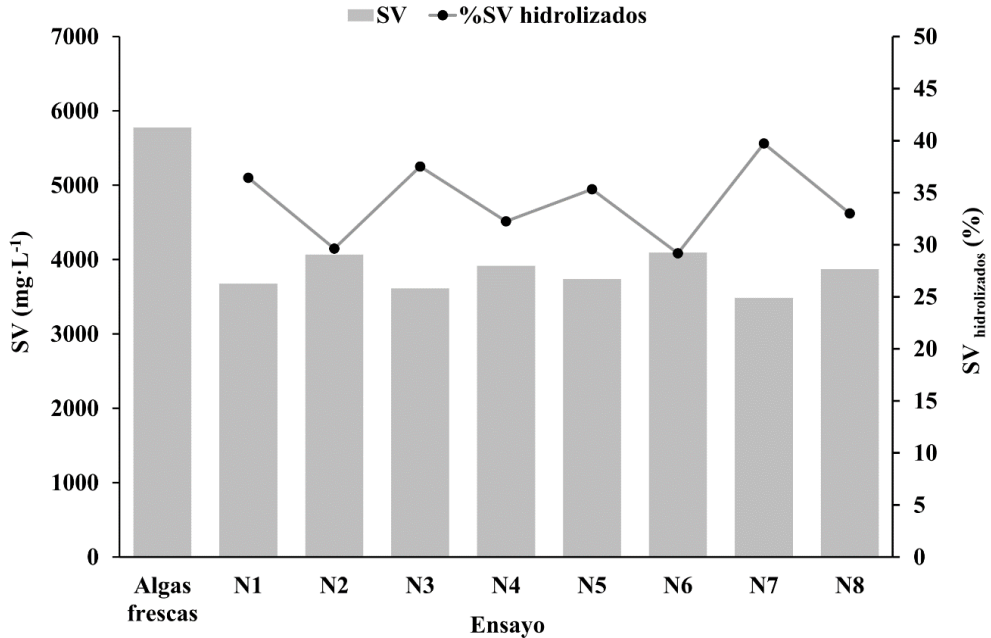


Figura 4.3. Sólidos volátiles de las microalgas frescas (sin pretratar) y tras los ensayos de pretratamiento, así como el porcentaje SV hidrolizados alcanzado en cada ensayo.

En la Figura 4.3 puede observarse que la reducción de la concentración de SV de la biomasa algal tras los distintos pretratamientos enzimáticos fue muy similar en todos los casos, de forma que el porcentaje de SV hidrolizados tuvo un bajo rango de variabilidad, el cual se mantuvo entre 29.2% y 39.7% (Tabla 4.2). Estos resultados sugieren que todos los pretratamientos enzimáticos darían lugar a biodegradabilidades de las microalgas *Scenedesmus* spp. muy semejantes entre sí, por lo que se llevó a cabo ensayos de digestión anaerobia de las microalgas pretratadas enzimáticamente, en *batch* y a 35°C, para comprobar si existe una correlación directa entre sólidos volátiles hidrolizados y biodegradabilidad de la biomasa algal.

Como resultado de los ensayos en *batch* de digestión anaerobia de la biomasa algal pretratada enzimáticamente, la Figura 4.4 muestra el volumen acumulado de metano

producido, normalizado por gramo de DQO de microalgas pretratadas enzimáticamente a 40°C (Figura 4.4a) y a 60°C (Figura 4.4b). La nomenclatura de los experimentos de esta figura se corresponde con la descrita en la Tabla 4.3, en la que se muestran los valores medios de BMP y biodegradabilidad resultantes de la digestión anaerobia en *batch* de la biomasa algal pretratada.

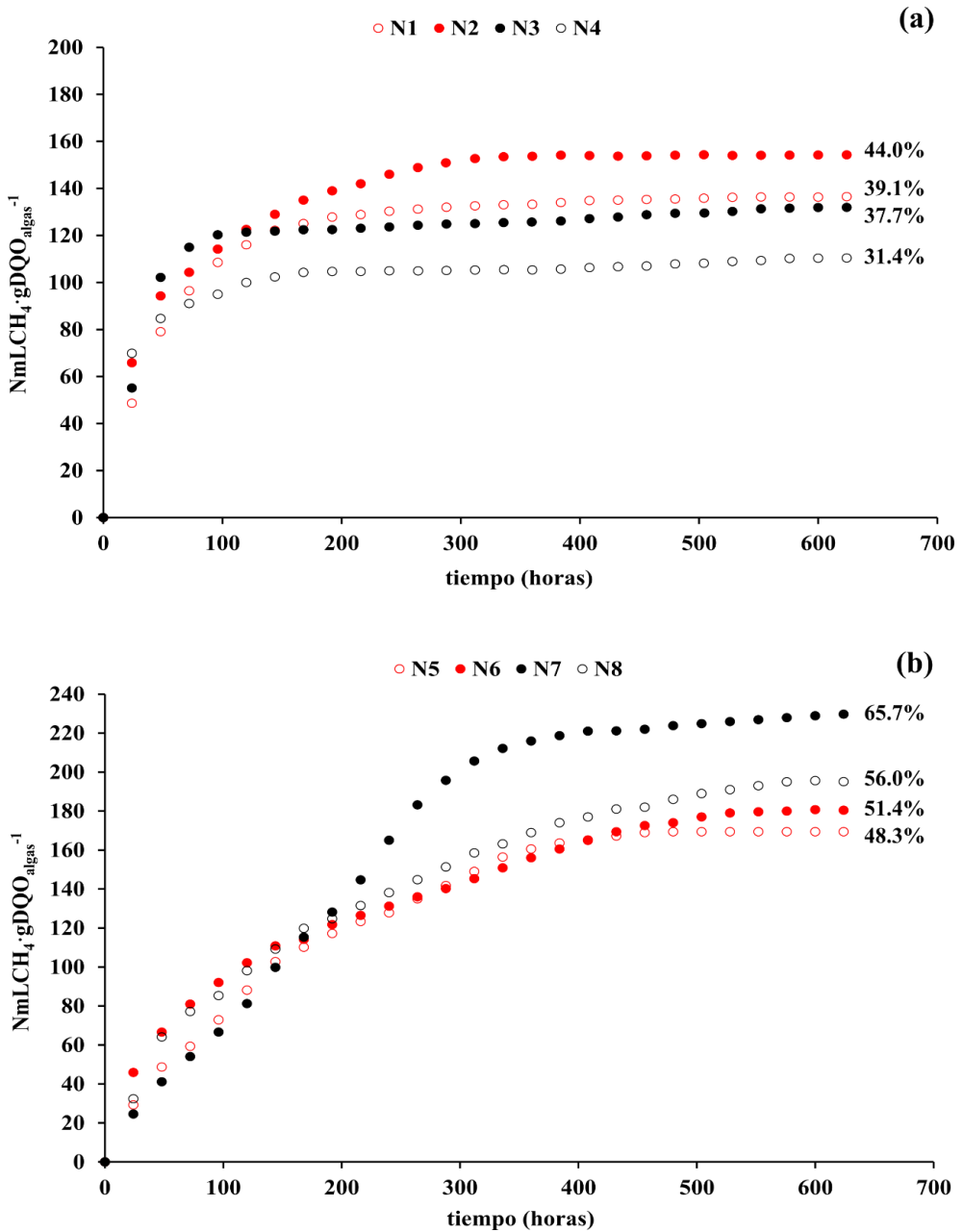


Figura 4.4. Producción media de metano resultante de la degradación anaerobia en *batch* de las microalgas pretratadas enzimáticamente a (a) 40°C y (b) 60°C. El valor junto a cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

Tabla 4.3. Condiciones experimentales de los pretratamientos, producción de metano resultante de la digestión anaerobia en batch de microalgas *Scenedesmus* spp. pretratadas enzimáticamente y biodegradabilidad alcanzada de la biomasa algal en cada ensayo.

	Dosis (mL·gST ⁻¹)	pH	T (°C)	BMP (mLCH ₄ ·gDQO _{algas} ⁻¹)	BMP (mLCH ₄ ·gSV _{algas} ⁻¹)	Biodegradabilidad (%)
N1	0.1	4.5	40	137	307	39.1
N2	0.5	4.5	40	154	363	44.0
N3	0.1	6.5	40	132	270	37.7
N4	0.5	6.5	40	110	222	31.4
N5	0.1	4.5	60	169	399	48.3
N6	0.5	4.5	60	180	378	51.4
N7	0.1	6.5	60	230	574	65.7
N8	0.5	6.5	60	196	392	56.0

En la Figura 4.4 y la Tabla 4.3 puede observarse que los valores de BMP obtenidos en los pretratamientos enzimáticos realizados a 60°C (Figura 4.4b) son superiores a los realizados a 40°C (Figura 4.4a), pese a que el porcentaje de SV hidrolizados fue muy similar en todos los ensayos (Tabla 4.2). Estos resultados indican que el pretratamiento enzimático a ambas temperaturas permite hidrolizar una parte de la biomasa algal, pero sólo la combinación de enzimas con una temperatura de 60°C consigue solubilizar el material coloidal intracelular liberado al medio tras la ruptura de la pared celular y, por tanto, alcanzar una mayor biodegradabilidad. Así pues, se demuestra la elevada influencia de este parámetro en el pretratamiento enzimático. Los distintos resultados obtenidos, en cuanto a sólidos hidrolizados y biodegradabilidad, siguen una tendencia similar a los observados por González-Fernández et al. (2012b), quienes reportaron que el porcentaje de solubilización de la microalgas *Scenedesmus* sp. era similar tras un pretratamiento térmico (sin enzimas) a 70°C y 90°C, aunque sólo el pretratamiento a 90°C produjo un incremento

significativo en la producción de biogás. Así mismo, otros autores han observado la misma diferencia entre solubilización y biodegradabilidad de la biomasa algal tras la aplicación de distintos pretratamientos tales como los pretratamientos físico-químicos o los pretratamientos mecánicos (Alzate et al., 2012; Bohutskyi et al., 2014; Cho et al., 2013; González-Fernández et al., 2012a).

Así pues, la máxima biometanización de la biomasa algal se produjo con el pretratamiento enzimático realizado a 60°C de temperatura, un pH de 6.5 y una dosis de enzima de 0.1 mL·gST⁻¹ (Figura 4.4b), correspondiente al ensayo N7, que dio lugar a una biodegradabilidad de 65.7% (Tabla 4.3). Este resultado fue superior al 51.7% de biodegradabilidad obtenido empleando las condiciones experimentales descritas por Mahdy et al. (2014) para las microalgas *Chlorella vulgaris* (ensayo E4, Tabla 4.1), lo cual corrobora que las condiciones experimentales del pretratamiento deben ser optimizadas para cada biomasa algal que se pretenda degradar.

Por otro lado, de los pretratamientos enzimáticos realizados a 40°C (Figura 4.4a), sólo el efecto combinado de esta temperatura con un pH de 4.5 y una dosis de enzima de 0.5 mL·gST⁻¹ (N2) produjo un ligero incremento de metano en comparación con las microalgas sin pretratar, desde 128 mLCH₄·gDQO⁻¹ hasta 154 mLCH₄·gDQO⁻¹ (Tabla 4.3). Sin embargo, a pesar de que en el ensayo N2 la biodegradabilidad la biomasa algal alcanzó un 44.0% (Tabla 4.3), este valor fue inferior al obtenido del ensayo E4 (51.7%), realizado a 50°C con la misma dosis y pH, lo que indica que una disminución de la temperatura aplicada en el pretratamiento enzimático disminuye la efectividad del mismo.

Cabe destacar que tanto a 40°C como a 60°C de temperatura, se detectó que existía la misma relación entre el pH y la dosis a la que se realizó el pretratamiento enzimático. El incremento de la dosis de enzima de 0.1 a 0.5 mL·gST⁻¹, provoca un incremento en la biometanización de la biomasa algal cuando el pretratamiento se realiza a un pH de 4.5 (Tabla 4.3). Sin embargo, cuando el pretratamiento se lleva a

cabo a un pH de 6.5, la dosis de enzima tiene un efecto contrario sobre la biodegradabilidad de las microalgas, de forma que la biometanización es mayor a una dosis de $0.1 \text{ mL} \cdot \text{gST}^{-1}$ que a una dosis de $0.5 \text{ mL} \cdot \text{gST}^{-1}$ (Tabla 4.3). Este efecto se debe a que, bajo ciertas condiciones operacionales, altas dosis del complejo enzimático provoca un fenómeno de adsorción competitiva, en el que las enzimas se adsorben temporalmente sobre componentes que no pueden hidrolizar. Cuando la aparición de este efecto es elevada, se produce un impedimento estérico de las enzimas, que bloquea su acceso a los componentes hidrolizables, lo cual influye negativamente en la ruptura de la pared celular de las microalgas y da lugar a una reducción en la tasa de hidrólisis (Zuorro et al., 2016).

A partir de los valores de BMP resultantes de los pretratamientos enzimáticos, se puede obtener un modelo de regresión que permita estimar el efecto de los tres factores estudiados sobre la biometanización de las microalgas *Scenedesmus* spp.: pH, temperatura y dosis de enzimas. Sin embargo, para hacer posible esta estimación, debe corroborarse que los valores de BMP obtenidos son producto de aplicar el pretratamiento bajo distintas condiciones experimentales, y no de la variabilidad asociada al error experimental.

Para tal fin, en la Figura 4.5 se muestran los valores de BMP obtenidos tras el pretratamiento enzimático de la biomasa algal, donde la nomenclatura de los experimentos se corresponde con la descrita en la Tabla 4.3, junto con el valor de BMP obtenido en el ensayo E4. El pretratamiento enzimático aplicado en el ensayo E4 se realizó bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4.1 y por triplicado, puesto que constituye el punto central del diseño ortogonal de experimentos. En esta figura se puede observar que la variabilidad de la biometanización de la biomasa algal generada con los distintos pretratamientos es muy superior a la del error experimental obtenido del experimento E4, lo que confirma que es posible llevar a cabo la estimación del efecto de los tres factores estudiados mediante un modelo de regresión. Además, la Figura 4.5 evidencia que

solo dos de los pretratamientos enzimáticos (N7 y N8), ambos realizados a 60°C, dan lugar a una mayor producción de metano que el pretratamiento realizado en el ensayo E4, en el cual se aplicaron las condiciones experimentales descritas por Mahdy et al. (2014).

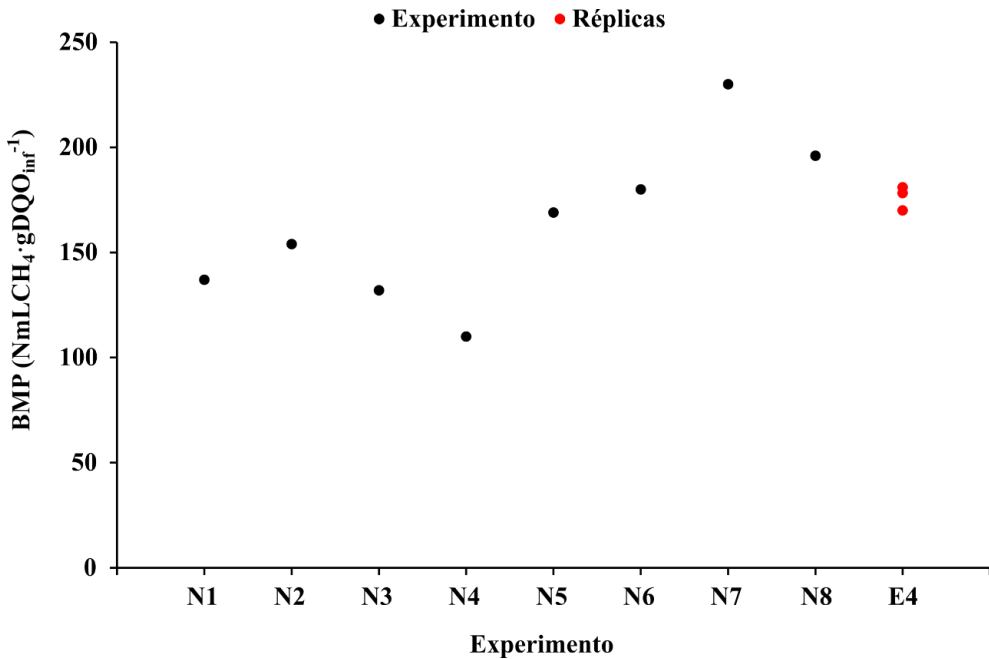


Figura 4.5. Producción de metano obtenido de los distintos pretratamientos enzimáticos frente al ensayo que se ha tomado como punto central del diseño de experimentos (E4).

En la Figura 4.6 se muestra el efecto simple de la dosis, el pH y la temperatura en el pretratamiento enzimático de la biomasa algal. En esta figura puede observarse que de los tres factores estudiados, la temperatura es el parámetro que tiene un mayor efecto en este tipo de pretratamiento (Figura 4.6c), tal y como se estableció anteriormente, dado que los cuatro ensayos realizados a 60°C (N5, N6, N7 y N8) son los que mayores valores de BMP produjeron. Sin embargo, observando la Figura 4.6a y Figura 4.6b también se puede apreciar que existe un efecto combinado de los factores de Dosis-pH y pH-T. En la interacción Dosis-pH se observa un efecto

cruzado, en el cual la BMP se incrementa con la combinación de un alto pH (Figura 4.6b) con una baja dosis y viceversa (Figura 4.6a) y, en la interacción pH-T, la biometanización se potencia con un pretratamiento a elevada temperatura (Figura 4.6c) y elevado pH (Figura 4.6b).

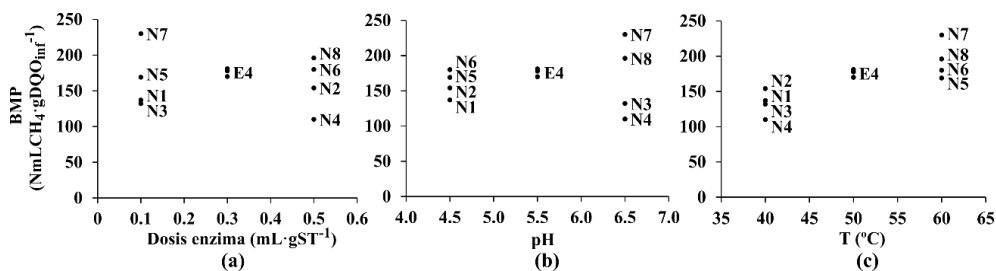


Figura 4.6. Evaluación del efecto simple de (a) la dosis de enzima, (b) el pH y (c) la temperatura sobre la BMP de las microalgas pretratadas enzimáticamente.

De esta forma, a partir de las condiciones experimentales establecidas y el valor de la BMP obtenido en cada ensayo, se puede estimar un modelo de regresión que sigue la ecuación mostrada a continuación (Ec. 4.1):

$$\text{BMP} = 327.875 + 327.5 \cdot \text{Dosis} - 59.5 \cdot \text{pH} - 5.3 \cdot \text{T} - 52.5 \cdot \text{Dosis} \cdot \text{pH} - 1.125 \cdot \text{Dosis} \cdot \text{T} + 1.575 \cdot \text{pH} \cdot \text{T} \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales, permitiendo su rápida aplicación para predecir la respuesta del proceso. Sin embargo, esta ecuación puede simplificarse matemáticamente para facilitar su interpretación si las variables se expresan según su codificación mostrada en la Tabla 3.1 (Pág. 93), resultando en la siguiente en la ecuación (Ec. 4.2):

$$\text{BMP} = 163.5 - 3.5 \cdot \text{Dosis} + 3.5 \cdot \text{pH} + 30.25 \cdot \text{T} - 10.5 \cdot \text{Dosis} \cdot \text{pH} - 2.25 \cdot \text{Dosis} \cdot \text{T} + 15.75 \cdot \text{pH} \cdot \text{T} \quad [\text{Ec. 4.2}]$$

donde el término independiente se corresponde con el valor de BMP de la biomasa algal tras aplicarle el pretratamiento correspondiente al punto central del estudio (E4), tal y como se muestra en la Figura 3.4 (Pág. 93). Este punto central se estableció en base a las condiciones experimentales reportadas por Mahdy et al. (2014), de forma que las variables codificadas como (0, 0, 0) se corresponden con una temperatura de 50°C, una dosis de enzimas de 0.3 mL·gST⁻¹ y un pH de 5.5. De esta forma, puede identificarse fácilmente los factores y la interacción de factores que mayor influencia tienen sobre el valor de BMP obtenido, pues serán aquellos que mayor coeficiente tengan.

La Figura 4.7 muestra el ajuste lineal realizado entre los valores de BMP obtenidos experimentalmente y los estimados a partir del modelo de regresión, junto con las bandas de confianza. En esta figura puede observarse que el valor del coeficiente de correlación (R^2) calculado del ajuste es de 0.9996, lo que indica que solo el 0.04% de la variación total no podría ser explicada por el modelo.

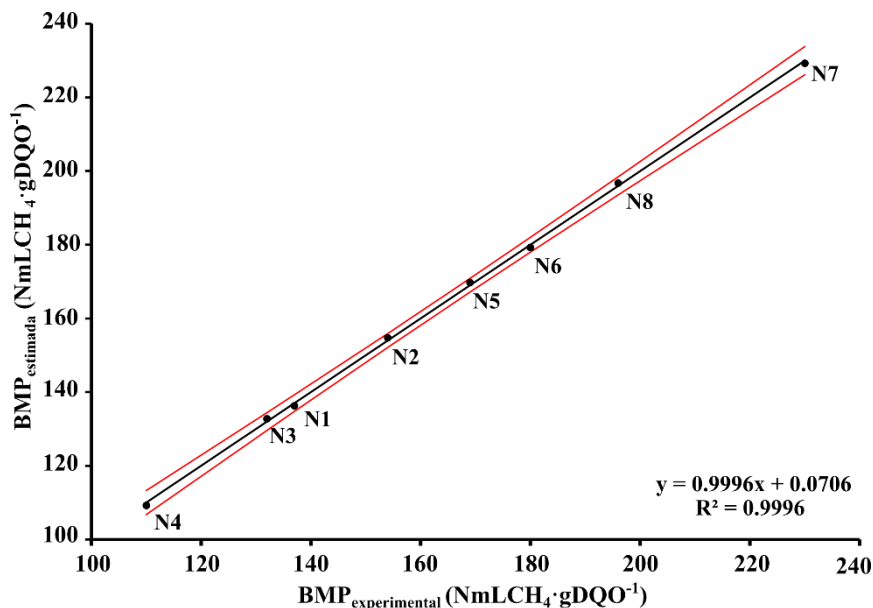


Figura 4.7. Ajuste de los valores de BMP obtenidos experimentalmente del pretratamiento enzimático y los estimados por el modelo, junto con las bandas de confianza (líneas rojas).

El p-valor de cada uno de los coeficientes del modelo obtenido se muestra en la Tabla 4.4, donde puede apreciarse que de los seis coeficientes, solo tres de ellos fueron estadísticamente significativos (resaltados en rojo) con un nivel de confianza del 95% y un error estándar de 2.1213.

Tabla 4.4. Análisis estadístico de los tres factores evaluados con respecto a la variable respuesta, BMP (mLCH₄·gDQO_{algas}⁻¹).

Factor	Coefficiente estimado⁽¹⁾	p-valor
Dosis	327.5	0.1344
pH	-59.5	0.1344
T	-5.3	0.0158
Dosis-pH	-52.5	0.0454
Dosis-T	-1.125	0.2048
pH-T	1.575	0.0303

⁽¹⁾ Error estándar del estimado = 2.1213

Para facilitar la interpretación del efecto contributivo de los factores estudiados, se generó el gráfico de superficie de respuesta, mostrado en el Figura 4.8, a partir del modelo de regresión obtenido, tanto en 2D (Figura 4.8a,c) como en 3D (Figura 4.8b,d). En esta figura se representa la variable respuesta (BMP) como una función en la que se varían dos de los factores estudiados, dosis y pH, mientras se mantiene constante la temperatura, siendo representada la variación de la BMP para las dos temperaturas a las que se realizaron los pretratamientos, 40°C (Figura 4.8a,b) y 60°C (Figura 4.8c,d).

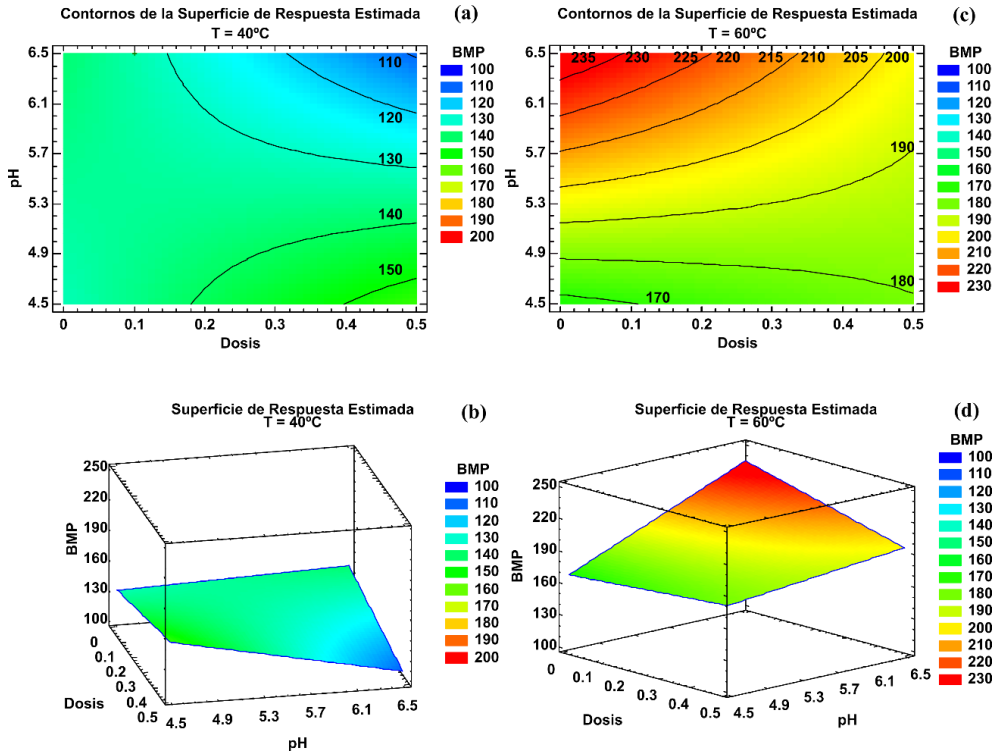


Figura 4.8. Contorno de la superficie de respuesta estimada del modelo de regresión obtenido, para la variación de la dosis y el pH a 40°C (a) y 60°C (c) y sus correspondientes representaciones de la superficie de respuesta (b) y (d).

En la Figura 4.8 se puede observar que, con el modelo de regresión, la mayor producción de metano se obtiene realizando el pretratamiento a una temperatura de 60°C con un pH elevado y una dosis de enzima baja (Figura 4.8c,d), tal y como ocurre experimentalmente, teniendo en cuenta que el modelo queda restringido a los rangos de pH, dosis y temperatura estudiados. El efecto de adsorción competitiva que se produce a elevadas dosis del complejo enzimático da lugar a que la biodegradabilidad de la biomasa algal se maximice a bajas dosis, hecho que además supone una reducción del coste económico. Sin embargo, la dosis no puede llegar a ser cero pues se ha demostrado el efecto nulo de aplicar únicamente el pretratamiento térmico, en ausencia de enzimas.

4.1.3. Conclusiones de los pretratamientos

El estudio de biodegradabilidad anaerobia de las microalgas *Scenedesmus* spp. mediante ensayos de BMP, demostró la importancia de seleccionar un inóculo con una alta actividad hidrolítica de los componentes de la pared celular de las microalgas para poder biometanizar este tipo de sustrato, ya que un fango previamente adaptado a la digestión anaerobia de microalgas incrementa la biodegradabilidad en un 11.7% con respecto a un fango no adaptado. Así mismo, se confirmó que el pretratamiento debe ser optimizado para cada biomasa algal, puesto que las condiciones experimentales reportadas por Mahdy et al. (2014) para la hidrólisis enzimática de microalgas *Chlorella vulgaris* (pH = 5.5, dosis = 0.3 mL·gST⁻¹ y temperatura = 50°C) produjeron un efecto significativamente menor sobre una biomasa algal dominada por *Scenedesmus* spp. La biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* se incrementó desde 36.7%, en ausencia de pretratamiento, hasta 65.7% tras un pretratamiento enzimático a 60°C de temperatura, una dosis de 0.1 mL·gST⁻¹ y un pH de 6.5.

Sin embargo, se observó que esta biodegradabilidad no mantiene una relación con los sólidos volátiles hidrolizados, ya que todos los pretratamientos dieron lugar a una reducción de sólidos muy similar, pero solo los realizados a 60°C incrementaron significativamente la biodegradabilidad de la biomasa algal en comparación con las microalgas sin pretratar.

En cuanto al pretratamiento realizado, se demostró experimentalmente que el pretratamiento térmico por sí sólo no incrementa la biometanización de las microalgas a esa temperatura pero, en adecuada combinación con el complejo enzimático y el pH, la temperatura tiene una elevada influencia sobre la hidrólisis enzimática. A su vez, se observó que, independientemente de la temperatura utilizada en el pretratamiento, una dosis de enzima de 0.5 mL·gST⁻¹ junto con un pH de 6.5 disminuía la biometanización de la biomasa algal en comparación con una

dosis $0.1 \text{ mL} \cdot \text{gST}^{-1}$ al mismo pH, como consecuencia de la aparición de un fenómeno de adsorción competitiva.

A pesar de haber logrado incrementar la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. empleando el inóculo más adecuado y un pretratamiento enzimático, son necesarios futuros estudios que se centren en la optimización del pretratamiento, así como en evaluar la digestión anaerobia de microalgas pretratadas enzimáticamente en un reactor en continuo, y su correspondiente estudio de viabilidad económica.

4.2. Digestión anaerobia de la biomasa algal en condiciones mesófilas

De forma independiente, se llevó a cabo la digestión anaerobia de microalgas en un reactor continuo en condiciones mesófilas, con el fin de comprobar si modificando las condiciones operacionales del reactor, puede incrementarse la actividad hidrolítica de la propia biomasa anaerobia sin necesidad de añadir enzimas hidrolíticas de forma externa, como se hizo en los ensayos de pretratamiento.

La experimentación tuvo una duración total de 912 días, durante los cuales se estudiaron seis periodos con distintas condiciones de operación. Estas condiciones operacionales se muestran en la Tabla 3.3 (Apartado 3.3.1 de Materiales y métodos, pág. 102). Tal y como se puede ver en dicha tabla, se establecieron cuatro TRCs distintos (50, 70, 100 y 140 días), se emplearon dos configuraciones de reactor (CSTR y AnMBR), se operó a dos TRH diferentes con el mismo TRC (50 y 15 días) para poder evaluar el efecto del incremento de la carga orgánica (de 0.2 a 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹) y se estudiaron dos tipos de biomasa algal bajo las mismas condiciones operacionales (M-IV y M-V), una compuesta en su mayoría por *Scenedesmus* spp. y otra en la que predominaba *Chlorella* spp. Cabe destacar que el último periodo de estudio (M-VI) no alcanzó el estado estacionario, pero presenta una clara tendencia en la evolución del proceso biológico que hace posible e interesante su comparación.

A partir de los resultados experimentales obtenidos de la digestión anaerobia de microalgas en un reactor a escala de laboratorio, operado en condiciones mesófilas (35°C), se analiza el efecto del tiempo de retención celular sobre la degradación de la biomasa algal en términos de producción de metano, así como la calidad del efluente y su posible reutilización para el cultivo de nueva biomasa algal. A su vez, se compararán los cambios observados tras modificar la configuración del reactor y la carga orgánica.

4.2.1. Caracterización de la biomasa algal empleada como sustrato

El conocimiento de las características físico-químicas de la biomasa algal utilizada como sustrato es fundamental para poder controlar y evaluar el proceso de digestión anaerobia, ya que permite mantener la carga orgánica establecida en cada periodo, realizar el balance de DQO necesario para identificar el estado pseudo-estacionario y conocer la eficiencia del proceso, evaluar el potencial de biometanización de la biomasa algal y conocer el grado de solubilización de nutrientes que se produce durante el proceso. En la Tabla 4.5 se muestra la caracterización de la biomasa algal en cada uno de los periodos estudiados.

Cabe destacar que la concentración de las microalgas para cada periodo experimental se fijó en base a su DQO, con el fin de poder mantener la carga orgánica para el TRH establecido.

Tabla 4.5. Caracterización de la biomasa algal alimentada en cada periodo de estudio del reactor mesófilo. Cada parámetro analizado se presenta como media \pm desviación estándar.

Periodo	M-I	M-II	M-III	M-IV	M-V	M-VI
DQO _T (mgO ₂ ·L ⁻¹)	9916 \pm 269	10023 \pm 64	6143 \pm 64	6095 \pm 134	6041 \pm 64	6242 \pm 179
DQOs (mgO ₂ ·L ⁻¹)	114.5 \pm 37.6	92.7 \pm 43.5	90.3 \pm 13.2	177.9 \pm 15.9	257.7 \pm 54.0	241 \pm 42.7
SST (mgSST·L ⁻¹)	6746 \pm 227	6936 \pm 226	4280 \pm 146	4196 \pm 192	4406 \pm 232	4312 \pm 294
SSV (mgSSV·L ⁻¹)	5907 \pm 337	5957 \pm 384	4064 \pm 47	3509 \pm 243	4020 \pm 171	3842 \pm 325
N _T (mgN·L ⁻¹)	519.3 \pm 73.5	518.3 \pm 60.3	298.2 \pm 47.1	410.8 \pm 10.8	420.0 \pm 46.3	395.1 \pm 35.4
N _s (mgN·L ⁻¹)	23.4 \pm 6.5	37.2 \pm 3.9	30.8 \pm 19.8	51.0 \pm 27.1	43.0 \pm 13.4	47.7 \pm 7.6
P _T (mgP·L ⁻¹)	122.0 \pm 38.8	95.0 \pm 20.5	58.4 \pm 10.4	56.5 \pm 9.2	63.8 \pm 16.9	59.4 \pm 6.1
NH ₄ ⁺ (mgN·L ⁻¹)	5.41 \pm 2.71	33.48 \pm 17.08	13.17 \pm 6.45	41.41 \pm 18.56	36.14 \pm 3.06	27.91 \pm 10.18
PO ₄ ³⁻ (mgP·L ⁻¹)	7.69 \pm 3.80	7.63 \pm 4.92	2.00 \pm 1.41	10.51 \pm 5.00	7.71 \pm 1.83	4.24 \pm 0.90
SO ₄ ²⁻ (mgSO ₄ ·L ⁻¹)	344.50 \pm 37.43	312.37 \pm 67.01	324.34 \pm 55.69	239.88 \pm 69.75	313.59 \pm 22.09	296.64 \pm 17.81
AGV (mgCH ₃ COOH·L ⁻¹)	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	114.25 \pm 36.70	29.42 \pm 8.73	20.03 \pm 5.51
ALK (mgCaCO ₃ ·L ⁻¹)	316.10 \pm 107.65	425.30 \pm 93.25	373.81 \pm 72.30	414.35 \pm 35.57	417.73 \pm 58.39	435.79 \pm 83.06
pH	7.31 \pm 0.21	7.36 \pm 0.15	7.43 \pm 0.17	7.39 \pm 0.21	7.58 \pm 0.12	7.38 \pm 0.15
Microalga (spp.) predominante (%especie)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)

⁽¹⁾ Valores inferiores al límite de detección.

La caracterización mostrada en la anterior tabla evidencia que la mayor parte de la materia orgánica se encuentra en forma particulada. La elevada fracción particulada de la biomasa algal junto con la resistencia que presentan estas microalgas a la degradación biológica, debido que la pared celular rígida que forma parte de su estructura, requerirá de un sistema con una alta actividad hidrolítica para poder alcanzar elevadas conversiones de la biomasa algal en metano.

Una de las vías para incrementar la actividad hidrolítica del proceso anaerobio es incrementar el tiempo de retención celular en el reactor (TRC). El establecimiento de elevados TRC posibilita el desarrollo de microorganismos con baja velocidad de crecimiento, incrementando la biodiversidad y por tanto, el potencial hidrolítico del sistema. Así mismo, el empleo de membranas de ultrafiltración como sistema de separación físico reduce todo riesgo de lavado de estos microorganismos ya que retiene toda la biomasa en el interior del sistema, dando lugar a mayores incrementos de la biodiversidad que la configuración CSTR convencional.

En base a dicha caracterización, en la Tabla 4.6 se muestra la relación molar de nitrógeno y fósforo con respecto a la fracción particulada de la materia orgánica que compone las microalgas, y el porcentaje que estos nutrientes representan de los sólidos medidos en la biomasa algal.

Tabla 4.6. Relación molar media y porcentaje de nitrógeno y fósforo con respecto a la materia orgánica particulada presente en las microalgas en cada periodo experimental.

Periodo	N/DQO	N/SST (%)	P/DQO	P/SST (%)
M-I	0.05	7.35	0.006	1.69
M-II	0.05	6.94	0.005	1.26
M-III	0.05	6.25	0.005	1.32
M-IV	0.06	8.57	0.004	1.09
M-V	0.07	8.55	0.005	1.29
M-VI	0.06	8.05	0.005	1.28

En esta tabla puede observarse que la relación de nutrientes en la biomasa se mantiene entre 0.05 y 0.07, para N/DQO, y entre 0.004 y 0.006 para P/DQO. Estos datos tienen un orden de magnitud similar a los reportados por Grobbelaar (2007), y a su vez coincide con el porcentaje que dichos nutrientes representan del total de sólidos, obtenidos por Golueke et al. (1957). Esto refleja el potencial de recuperación de nutrientes si se alcanzara un elevado nivel de biodegradación a través de la digestión anaerobia, ya que daría lugar a la liberación de una elevada cantidad de amonio y fosfato (Wang et al., 2013).

Un aspecto a tener en cuenta de la caracterización mostrada en la Tabla 4.5 es el tipo de microalga alimentado en cada periodo experimental, puesto que puede afectar a la producción de biogás. El género de microalga viene definido por las condiciones operacionales establecidas en la planta piloto MPBR, siendo *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp. los géneros que predominaron a lo largo de la experimentación. Ambas microalgas presentan una estructura celular muy similar, ya que tienen una pared celular rígida compuesta por polisacáridos que dificulta su biodegradación (Němcová, 2003; Tijani et al., 2015). Sin embargo, su composición en carbohidratos, proteínas y lípidos puede variar en gran medida, no sólo entre géneros sino también en función de las condiciones experimentales en las que se cultiven (Biller and Ross, 2014; Tijani et al., 2015). Así mismo, ambas microalgas pueden distinguirse claramente en cuanto a tamaño y disposición en el medio, puesto que pueden encontrarse como células individuales o formando agregados. De esta forma, todas las diferencias que presentan ambas microalgas pueden dar lugar a variaciones en la biometanización obtenida durante el proceso anaerobio, lo cual será evaluado en la presente tesis.

4.2.2. Estabilidad del proceso en los periodos de estudio

La evaluación de los cambios operacionales realizados en cada uno de los periodos experimentales debe realizarse una vez el proceso haya alcanzado el estado pseudo-

estacionario, con el fin de evitar posibles interpretaciones erróneas. La identificación de los distintos estados pseudo-estacionarios se realizó en base a los siguientes criterios: estabilidad de los sólidos en el reactor y de la producción de biogás, y la ausencia de acumulación en el balance de materia.

En la Figura 4.9, en la que se muestra la evolución de los sólidos totales y volátiles y el porcentaje de sólidos volátiles, la línea discontinua representa la incorporación al reactor de la membrana de ultrafiltración y las zonas sombreadas destacan los estados pseudo-estacionarios detectados, identificándose cinco estados pseudo-estacionarios según la estabilidad de los sólidos en el reactor.

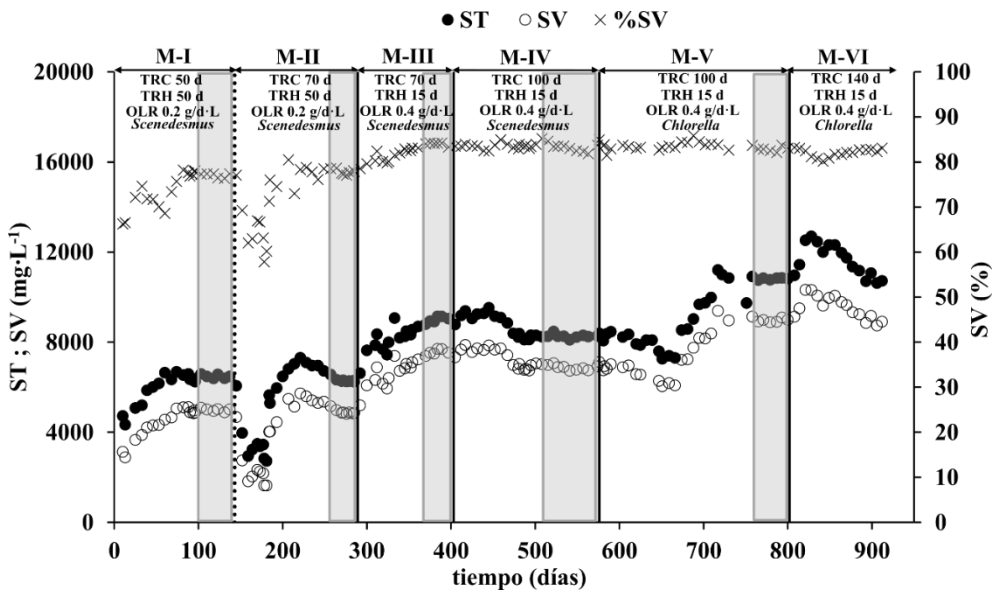


Figura 4.9. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles en el reactor mesófilo junto con los estados pseudo-estacionarios detectados en la experimentación.

Cabe destacar que el último periodo estudiado (M-VI) no alcanzó el estado pseudo-estacionario, ya que fue operado durante 110 días. Sin embargo, este periodo muestra una clara tendencia que permite diferenciarlo y compararlo con los anteriores periodos.

La Figura 4.10 muestra el balance de materia para cada uno de los periodos pseudo-estacionarios identificados, en términos de DQO ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) alimentada al reactor y DQO ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) efluente del mismo, donde la salida es representada como la suma de las distintas corrientes que la componen. Este balance de materia ha sido calculado mediante la ecuación 3.3 para el periodo M-I, en el que se operó el reactor bajo la configuración CSTR. Este tipo de reactor presenta tres corrientes que se deben tener en cuenta para efectuar el balance de materia: (i) entrada, la cual representa la corriente de microalgas alimentadas al reactor, (ii) biogás, producto de la transformación anaerobia de las microalgas bien sea por acción de microorganismos metanógenos o sulfato-reductores, y (iii) salida, la cual se corresponde con la purga de fango. En el caso de la configuración AnMBR, correspondiente al resto de periodos experimentales, el balance fue calculado mediante la ecuación 3.4. El balance de materia aplicado a un reactor AnMBR tiene en cuenta las mismas corrientes presentes en la configuración CSTR pero, en este caso, la corriente de salida no se compone únicamente de la purga sino también del (iv) permeado que resulta del proceso de filtración mediante la membrana de ultrafiltración.

En ambos casos, toda aquella materia orgánica introducida al reactor que no se haya contabilizado en alguna de las salidas y, por tanto, quede retenida dentro del reactor, será la correspondiente al término de acumulación. Este término de acumulación debe ser nulo una vez se ha alcanzado el estado pseudo-estacionario, el cual se considerará como tal cuando su valor sea inferior a un 5% de la DQO total influente.

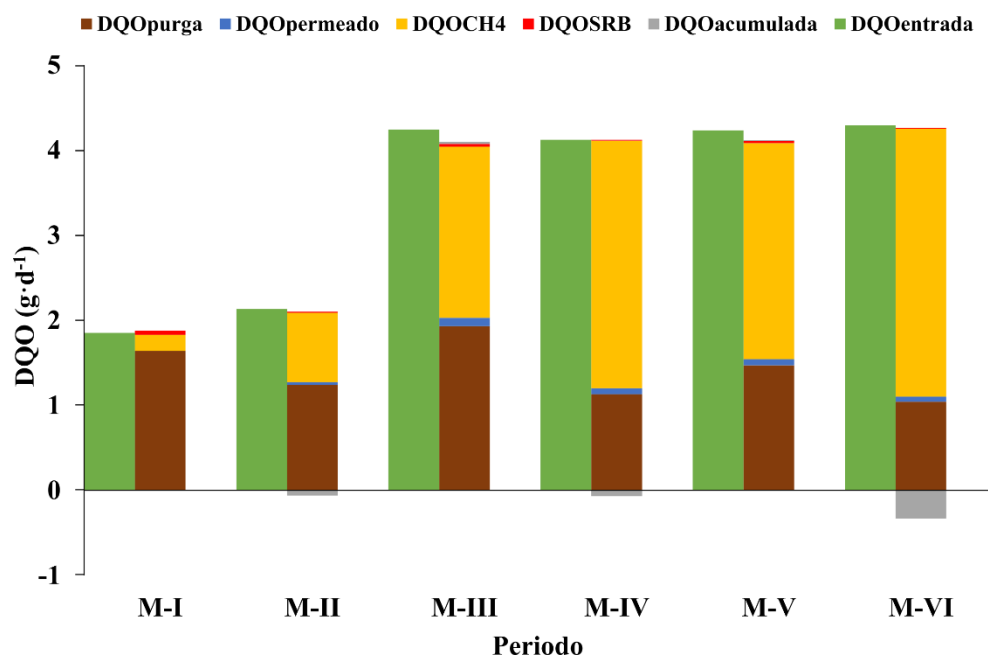


Figura 4.10. Balance de DQO en cada periodo experimental en términos de carga de DQO influente y distribución de la carga de DQO efluente.

En la Figura 4.10 puede observarse cómo el término de entrada coincide con la suma de los términos correspondientes a la salida, cerrándose el balance de DQO para cada uno de los periodos experimentales con un bajo porcentaje de error (Tabla 4.7). A su vez, se demuestra la estabilidad del proceso en cada uno de los periodos seleccionados (M-I a M-V) en la Figura 4.9, ya que el porcentaje de DQO acumulada en el reactor es inferior al 5% de la DQO total, como se muestra en la Tabla 4.7. En el caso del periodo M-VI, tanto en la Figura 4.10 como en la Tabla 4.7, se demuestra que éste todavía no cumple los criterios de estabilidad establecidos puesto que presenta una acumulación muy superior al resto de periodos experimentales y los sólidos en el reactor (Figura 4.9) no llegan a estar estables.

Tabla 4.7. Porcentaje de error en el balance de materia y porcentaje de DQO acumulada con respecto a la DQO alimentada en cada uno de los periodos experimentales estudiados.

	%Error_{Balance}⁽¹⁾	%DQO_{Acumulada}⁽²⁾
M-I	-1.51	0.00
M-II	4.24	-2.86
M-III	3.42	0.54
M-IV	1.70	-1.70
M-V	2.65	0.31
M-VI	8.39	-7.69

⁽¹⁾ Calculado mediante la ecuación 3.10 (pág. 112).

⁽²⁾ Calculado mediante la ecuación 3.11 (pág. 112).

4.2.3. Efecto de las condiciones operacionales sobre la biodegradabilidad de la biomasa algal

Con el fin de maximizar la producción de metano a partir de la biomasa algal procedente del post-tratamiento de un efluente anaerobio, objetivo principal de esta tesis, los parámetros operacionales fueron modificándose a lo largo de la experimentación para estudiar su influencia. Las condiciones operacionales establecidas en cada periodo experimental así como la caracterización de las microalgas alimentadas en cada periodo, se muestran en la Tabla 3.3 (Pág. 102) y Tabla 4.5 respectivamente.

El efecto del TRC sobre la biodegradabilidad de las microalgas fue inicialmente evaluado comparando una configuración convencional CSTR con la configuración avanzada AnMBR. Posteriormente, con la configuración AnMBR, se incrementó el TRC de forma progresiva con el propósito de conocer su impacto en la producción de metano, tanto para una biomasa algal dominada por *Scenedesmus* spp. como para una biomasa dominada por *Chlorella* spp.

4.2.3.1. Efecto de la configuración del reactor y del TRC

La digestión anaerobia de microalgas en condiciones mesófilas fue inicialmente llevada a cabo en un reactor CSTR, en el que se estableció un TRC de 50 días y se alimentó con una OLR de $0.2 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (Periodo M-I). El TRC se fijó en 50 días con el fin de comprobar si, bajo esta configuración, se podía obtener una mayor biodegradabilidad de *Scenedesmus* spp. que la reportada por previos estudios, los cuales se resumen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resumen bibliográfico de la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* en CSTRs mesófilos operados a distintos valores de TRC.

Microalga	TRC (días)	Biodegradabilidad (BMP)	Referencia
<i>Scenedesmus</i> sp.	15.0	9.43% (33 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹)	Gonzalez-Fernandez et al. (2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	23.0	22% (84 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹)	González-Fernández et al. (2012b)
<i>Chlorella-Scenedesmus</i>	10.0	26.0% ⁽²⁾ (143 mLCH ₄ ·gSV ⁻¹)	Yen and Brune (2007)
<i>Scenedesmus</i> spp. AMDD	16.0	52% (90 mLCH ₄ ·gSV ⁻¹)	Tartakovsky et al. (2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	12.4	25.5% ⁽²⁾ (140 mLCH ₄ ·gSV ⁻¹)	Tran et al. (2014)
Biomasa algal (Contiene <i>Scenedesmus</i> sp.)	15.0	25.7% ⁽¹⁾ (90 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹)	Passos et al. (2014a)
Biomasa algal (Contiene <i>Scenedesmus</i> sp.)	20.0	34.3% ⁽¹⁾ (120 mLCH ₄ ·gDQO ⁻¹)	Passos et al. (2014a)

⁽¹⁾ Valores de calculados en base a una producción máxima teórica de 350 mLCH₄·gDQO⁻¹.

⁽²⁾ Valores calculados en base a una producción máxima teórica de 549 mLCH₄·gSV⁻¹.

La Figura 4.11 muestra la evolución de la producción de biogás en el reactor mesófilo durante los 912 días de experimentación, junto con el porcentaje de metano presente en el biogás y los fallos de operación sucedidos (Figura 4.11a), y el rendimiento del proceso en cada periodo en términos de metano producido por gramo de DQO influente junto con el porcentaje de DQO eliminada (Figura 4.11b). Así mismo, la Tabla 4.9 resume la producción y composición media del biogás en los seis periodos, y el rendimiento del proceso en términos de producción de metano por gramo de DQO influente, de eliminación de DQO y de biodegradabilidad. El porcentaje de eliminación de DQO se calculó mediante la ecuación 3.13, en base a los valores del balance de materia mostrados en la Figura 4.10, y el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal se calculó mediante la ecuación 3.15. En esta tabla puede observarse que la biodegradabilidad es aproximadamente un 2% inferior a la eliminación de DQO debido a que parte de esta DQO es eliminada por las SRB, pero éstas no contribuyen a la producción de metano. La presencia de SRB en el reactor se debe a la concentración de sulfato que se alimentan con la biomasa algal (ver Tabla 4.5).

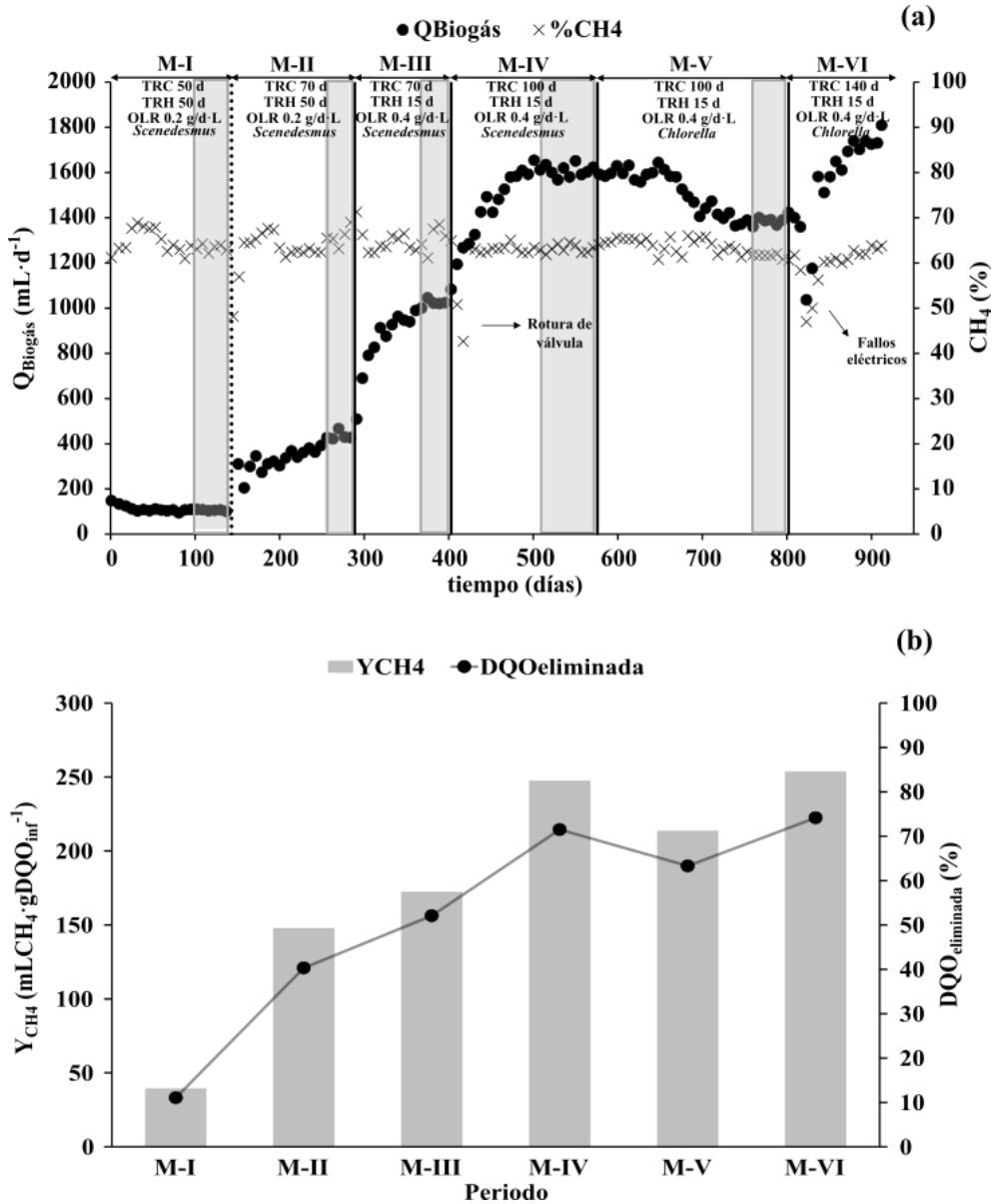


Figura 4.11. Evolución de la producción de biogás y porcentaje de metano en el mismo (a) y rendimiento de producción de metano y eliminación de DQO (b) durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Como puede observarse en la Figura 4.11a, bajo las condiciones de operación del periodo M-I solo se alcanzó una producción de biogás en torno a los $106 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$, con una composición en metano del 63.5%, equivalente a $39.5 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ y a una eliminación de DQO del 12.1% (Figura 4.11b). Este último resultado es ligeramente superior al 9.4% obtenido por González-Fernández et al. (2013) para *Scenedesmus* sp. sin pretratar, en un CSTR con 15 días de TRC, lo cual demuestra tanto la elevada resistencia que presenta es tipo de microalga a la digestión anaerobia, como la necesidad de incrementar la actividad hidrolítica de los microorganismos para alcanzar una elevada biodegradabilidad. La resistencia a la biodegradación de las microalgas *Scenedesmus* viene dada por la pared celular rígida que forma parte de su estructura, la cual está compuesta por polisacáridos como se ha descrito anteriormente. La presencia de dicha pared celular hace necesario el desarrollo de una población microbiana en el digestor, con una alta actividad hidrolítica, capaz de degradar los distintos componentes de la biomasa algal.

La actividad hidrolítica de la biomasa anaerobia puede incrementarse operando el reactor a TRC elevados. Sin embargo, empleando la configuración convencional CSTR, trabajar a elevados TRC manteniendo el caudal de tratamiento implica la necesidad de incrementar el volumen del reactor, con el consecuente incremento de las necesidades de superficie y de los costes. Por ello, para incrementar la actividad hidrolítica del sistema y, por tanto, la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp., la configuración del reactor fue modificada mediante la incorporación de un módulo de membrana de ultrafiltración al CSTR, transformándolo en un AnMBR. El empleo de un sistema físico de separación por membranas permite desacoplar el TRC del TRH, haciendo posible la operación del digestor a elevados TRC y manteniendo el caudal de tratamiento.

Así mismo, permite incluso trabajar a elevados caudales de tratamiento sin necesidad de incrementar el volumen de reacción y evita toda posibilidad de lavado de los microorganismos, debido al pequeño tamaño de poro de la membrana.

Así pues, tras la incorporación del módulo de membrana, el TRC del reactor AnMBR se incrementó hasta 70 días, manteniendo el TRH en 50 días y la OLR en $0.2 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (Periodo M-II). Una vez el proceso alcanzó el estado estacionario, se observó un incremento significativo de la eliminación de DQO hasta el 43.3% y de la biodegradabilidad hasta el 42.3%, dando lugar a una producción de metano de $147.9 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ (Figura 4.11, Tabla 4.9). Este incremento, principalmente asociado al efecto de extender el TRC mediante la incorporación de la membrana, corrobora que la elevada retención de la biomasa anaerobia en el sistema promueve el desarrollo de microorganismos con una baja tasa de crecimiento, involucrados en la degradación de las microalgas, considerándose la configuración AnMBR como una alternativa tecnológica viable para operar a elevados TRC, y así maximizar la producción de metano a partir de biomasa algal.

Tabla 4.9. Rendimiento del proceso anaerobio en términos de producción de biogás y metano, eliminación de DQO y biometanización en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresados como media \pm desviación estándar.

	$Q_{\text{biogás}}$ ($\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$)	CH_4 (%)	Y_{CH_4} ($\text{mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$)	$\text{DQO}_{\text{eliminada}}$ (%)	Biodegradabilidad (%)
M-I	106.0 ± 2.0	63.5 ± 0.9	39.5 ± 2.9	12.1 ± 0.7	11.3 ± 0.6
M-II	441.2 ± 22.8	66.2 ± 2.9	147.9 ± 7.4	43.3 ± 1.2	42.3 ± 1.4
M-III	1027.8 ± 11.8	67.3 ± 1.3	172.5 ± 6.9	52.1 ± 0.2	50.1 ± 1.8
M-IV	1609.4 ± 27.4	63.0 ± 1.1	247.7 ± 8.0	72.3 ± 0.9	70.9 ± 2.3
M-V	1393.2 ± 18.1	61.9 ± 0.6	213.7 ± 7.2	63.3 ± 0.7	61.8 ± 2.1
M-VI	1734.1 ± 37.5	62.6 ± 1.1	258.7 ± 9.1	75.1 ± 1.2	73.9 ± 2.6

El incremento de la actividad hidrolítica de la biomasa puede también observarse en la producción de AGV en el digestor, tras realizar el cambio de configuración y de

las condiciones operacionales. Como se muestra en la Figura 4.12, las nuevas condiciones experimentales del periodo M-II causaron la presencia de una mayor concentración de AGV disponibles para las archaeas metanogénicas, debido a una mayor hidrólisis del sustrato. Dado que las bacterias hidrolíticas tienen una mayor tasa de crecimiento que los microorganismos metanógenos, se produjo una ligera acumulación temporal de ácidos en el sistema. A medida que el proceso evolucionó, estos AGV fueron descendiendo como consecuencia del desarrollo y adaptación de los metanógenos, gracias al efecto de la elevada retención en el reactor, dando lugar a una producción de biogás de 4.2 veces superior a la obtenida en el periodo M-I (Figura 4.11a, Tabla 4.9).

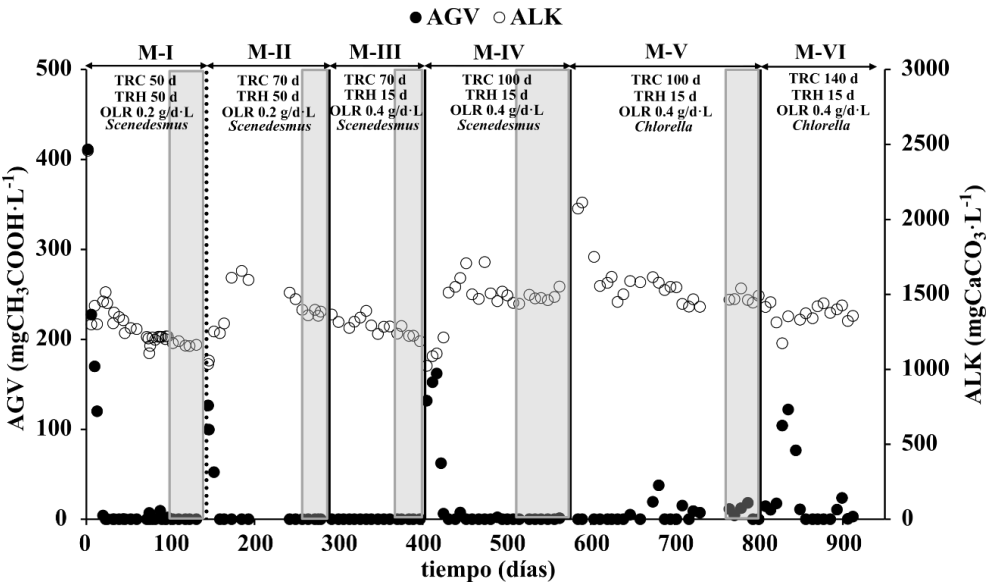


Figura 4.12. Evolución de los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

4.2.3.2. Incremento de la velocidad de carga orgánica

En el periodo M-III, se incrementó la OLR de 0.2 a 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹, manteniendo el resto de condiciones operacionales, con el fin de comprobar la mayor actividad hidrolítica en el sistema. El incremento de carga orgánica se realizó disminuyendo el TRH desde 50 hasta 15 días y la concentración de DQO de las microalgas alimentadas desde 10023 hasta 6143 mgO₂·L⁻¹. La flexibilidad operacional que proporciona el uso de membranas al posibilitar la independencia del TRC y el TRH, permite incrementar el caudal de tratamiento sin modificar el volumen de trabajo del reactor, así como trabajar con corrientes más diluidas sin riesgo de lavar el reactor, lo cual también contribuye a la reducción de los costes energéticos asociados a la concentración de microalgas.

De esta forma, una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, el incremento de la OLR hasta 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹ dio lugar a una producción de biogás de 1027.8 mL·d⁻¹ (Figura 4.11a), correspondiente a una eliminación de DQO del 52.1% y una producción de metano de 172.5 mLCH₄·gDQO_{inf}⁻¹ (Figura 4.11b, Tabla 4.9). Estos resultados corroboran que se ha desarrollado una población microbiana con una mayor capacidad hidrolítica en el sistema, capaz degradar mayores cargas de biomasa algal. Además, la ausencia de AGV en el digestor tras incrementar la carga (Figura 4.12), demuestra que: (i) el proceso fue capaz de adaptarse al incremento de la carga dado que no tuvo lugar una sobrecarga del sistema, (ii) y denota el incremento de la población de archaeas, como consecuencia de la elevada retención de los microorganismos que provoca el operar el reactor a un alto TRC. Dado que las archaeas se caracterizan por una tasa de crecimiento inferior al resto de microorganismos anaerobios, evitar su lavado del reactor es un factor clave para asegurar el equilibrio del proceso y maximizar la producción de biogás (Shin et al., 2011; Tabatabaei et al., 2010).

Así mismo, la adaptación de la biomasa anaerobia al sustrato puede verse claramente reflejada en la evolución temporal de la producción de biogás, mostrada en la Figura 4.11a. En esta figura se observa cómo en el periodo M-II la producción de biogás se incrementa progresivamente, a medida que los microorganismos hidrolíticos crecen y se adaptan a degradar la biomasa algal, y la población de archaeas se va desarrollando y consumiendo los AGV presentes en el sistema. Sin embargo, en el periodo M-III la producción de biogás se incrementa a mayor velocidad en ausencia de acumulación AGV, necesitando un menor periodo de tiempo para alcanzar el estado pseudo-estacionario, como consecuencia del desarrollo de una biomasa anaerobia capaz de degradar este sustrato.

Los resultados obtenidos en este periodo, siguen una tendencia similar a los mostrados por González-Fernández et al. (2013), quienes detectaron un incremento en la producción de metano de 96.9 a 111.4 mLCH₄·gDQO⁻¹ tras aumentar 2.5 veces la carga orgánica de microalgas. Por el contrario, Tartakovsky et al. (2013) reportaron un descenso de la eficiencia del proceso del 14%, cuando incrementaron la OLR de *Scenedesmus* sp. AMDD de 0.19 a 0.34 g·d⁻¹·L⁻¹ en un reactor CSTR operado a 58 días de TRC, debido a la inhibición del proceso por la formación y acumulación de los compuestos intermedios producidos durante la digestión.

Estos resultados demuestran que una biomasa adaptada a un sustrato resistente a la degradación biológica, como son las microalgas, permite una respuesta más rápida del sistema, incrementando el porcentaje biodegradado del sustrato y evitando la posible desestabilización del proceso por acumulación de ácidos, así como la viabilidad de la tecnología de membranas para favorecer dicha adaptación. Así mismo, se demuestra también que la operación del reactor AnMBR a TRCs elevados da lugar a una mayor producción de metano y, por tanto, podría ser la clave para maximizar la valorización energética de la biomasa algal en forma de biogás.

4.2.3.3. Incremento del TRC bajo la configuración AnMBR

En el periodo M-IV se procedió a incrementar el TRC en el reactor de 70 a 100 días, manteniendo el resto de condiciones operacionales establecidas en el periodo M-III, con el propósito de incrementar la producción de biogás a partir de las microalgas *Scenedesmus* spp., promoviendo el desarrollo de una comunidad microbiana fuertemente hidrolítica.

La Figura 4.12 muestra que el incremento del tiempo de residencia en el reactor produjo una acumulación de AGV durante las primeras semanas de operación, lo cual denota un incremento en la hidrólisis de la biomasa algal como consecuencia de la potenciación en el sistema de una comunidad bacteriana con elevada actividad hidrolítica. De la misma forma que ocurrió en el periodo M-II, dada la menor tasa de crecimiento de las archaeas metanogénicas con respecto a las bacterias hidrolíticas, se detectaron estos AGV en el sistema durante el primer mes del periodo experimental (M-IV). La tendencia descendente de los AGV sugirió que se estaba llevando a cabo el progresivo desarrollo de la población metanógena, la cual fue capaz de consumir por completo los ácidos y equilibrar de nuevo el sistema.

Pese a que los distintos cambios operacionales realizados a lo largo de toda la experimentación generaron la acumulación temporal de AGV en algunos de los periodos estudiados, la elevada alcalinidad del sistema (Figura 4.12) proporcionó una adecuada capacidad tamponante en todo momento, evitándose así el riesgo de acidificación en el reactor.

Una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario en el periodo M-IV, el desarrollo de una comunidad microbiana con una elevada actividad hidrolítica, adaptada a la degradación de las microalgas *Scenedesmus* spp., dio lugar a una producción de biogás 15.2 veces superior a la obtenida en el periodo M-I, alcanzando un caudal diario medio de $1609.4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ correspondiente a una biodegradabilidad del 70.9% y a un rendimiento de producción de metano de $247.7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ (Figura

4.11, Tabla 4.9). La bibliografía existente sobre la digestión anaerobia de las microalgas pertenecientes al género *Scenedesmus*, presenta una amplia variedad de resultados en cuanto a la eficiencia del proceso. González-Fernández et al. (2013) encontraron que, bajo la configuración CSTR y un TRH de 15 días e igual al TRC, la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* sp. solo alcanzaba un 9.4%, mientras que González-Fernández et al. (2012) obtuvieron una biodegradabilidad de estas microalgas del 24% en un CSTR operado a 23 días de TRC. Este último resultado fue muy similar al 26% reportado por Zamalloa et al. (2012) durante la digestión anaerobia de la especie *Scenedesmus obliquus* en un reactor híbrido de flujo ascendente, y ligeramente inferior al publicado por Tran et al. (2014) quienes encontraron un 30% de eficiencia en el proceso de digestión anaerobia de una biomasa algal dominada por *Scenedesmus* spp., en un CSTR operado a 12.4 días de TRC. Uno de los datos bibliográficos de biodegradabilidad anaerobia de las microalgas *Scenedesmus* más elevados, fue el obtenido por Tartakovsky et al. (2013) para la especie *Scenedesmus* sp. AMDD. Estos autores alcanzaron una biodegradabilidad del 52-53% en un CSTR, operado a 16-58 días de TRC. Según describen diversos estudios, esta variabilidad se debe a la composición de la pared celular de cada microalga en concreto, así como al medio de cultivo empleado y a las condiciones operacionales establecidas para su crecimiento, y al tiempo de almacenamiento de la biomasa algal antes de ser sometida a la digestión anaerobia (Dębowski et al., 2013; Frigon et al., 2013; González-Fernández et al., 2013).

Sin embargo, pese a la gran variabilidad de resultados existente, el 70.9% de biodegradabilidad obtenido en esta tesis da lugar a uno de los mayores rendimientos alcanzados hasta el momento para el proceso de digestión anaerobia de microalgas *Scenedesmus* spp. sin pretratar, cultivadas en agua residual y bajo condiciones de estrés debido al bombeo y filtración a los que se someten en la planta piloto MPBR. Este resultado demuestra la ventaja que supone operar el reactor a elevados TRCs, mediante la total retención de la biomasa en el sistema haciendo uso de la tecnología

de membranas, ya que se incrementa la actividad hidrolítica del fango con la consecuente mejora de la producción de biogás.

Con el propósito de comprobar que la elevada biodegradabilidad obtenida es debida a la potenciación de una biomasa con una elevada actividad hidrolítica, se tomaron cinco muestras durante el estado pseudo-estacionario de este periodo (M-IV) para llevar a cabo su análisis microbiológico. Este análisis genómico, mostrado posteriormente en el apartado 4.4, permitirá tanto corroborar la hipótesis planteada como identificar los microorganismos involucrados en la degradación de microalgas y que permiten optimizar el proceso.

4.2.3.4. Cambio del tipo de microalga. Digestión anaerobia de biomasa algal dominada por *Chlorella* spp.

Chlorella es una microalga que, al igual que *Scenedesmus*, crece de forma espontánea en las corrientes de agua residual (Viruela et al., 2016). El predominio de un tipo de microalga dependerá de las condiciones operacionales establecidas para su cultivo y de ciertas características de la corriente de agua residual a tratar, como puede ser la presencia de sulfuros (Gupta et al., 2016; Ronda et al., 2014). La morfología de estas microalgas es muy similar a la de *Scenedesmus*, pues ambas presentan una pared celular rígida que dificulta su biodegradación. Sin embargo, *Chlorella* da lugar a mayores producciones de biogás debido a que su menor tamaño la hace más bioaccesible para los microorganismos anaerobios (Frigon et al., 2013; Mussnug et al., 2010).

En el periodo M-V se produjo un cambio progresivo de la especie dominante en la planta MPBR, de *Scenedesmus* spp. a *Chlorella* spp. Por ello, en este periodo se evaluó la biodegradabilidad anaerobia de las microalgas *Chlorella* spp., bajo las mismas condiciones operacionales que en el periodo M-IV (TRC = 100 días, TRH = 15 días y OLR = $0.4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), con el fin de obtener también una elevada producción

de metano a partir de esta microalga dada la alta actividad hidrolítica que exhibe la biomasa anaerobia.

La Figura 4.11 muestra que la producción de biogás alcanzó un valor medio de $1393.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$, equivalente a una biodegradabilidad del 61.8% y una producción de metano de $213.7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ (Tabla 4.9). Otros autores también reportaron elevadas biodegradabilidades de este tipo de microalga, Sanz et al. (2017) obtuvieron un 37% de eliminación DQO operando un CSTR mesófilo con 15 días de TRH, muy similar a la reportada por Mendez et al. (2015) para las mismas condiciones, mientras que Ras et al. (2011) alcanzaron un rendimiento del 51% con un TRH de 28 días. No obstante, el resultado obtenido en el periodo M-V una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, es superior a cualquiera de los reportados hasta el momento para la microalga *Chlorella* spp. sin pretratar. Por lo tanto, se corrobora que la eficiencia de la digestión anaerobia de microalgas se incrementa al operar el reactor a elevados TRCs.

Sin embargo, en contra de lo esperado en base a la bibliografía, la producción de biogás descendió 1.16 veces con respecto al periodo M-IV, en el que se degradó anaeróbicamente *Scenedesmus* spp. empleando las mismas condiciones experimentales, reduciéndose el rendimiento del proceso en casi un 10%. Esto se asocia a las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo de las microalgas en la planta MPBR, en las cuales *Chlorella* es cultivada con una corriente de agua residual real y bajo condiciones de estrés, dificultando su biodegradación en mayor medida que en las microalgas *Scenedesmus*. Estas condiciones difieren de la mayoría de estudios reportados en los que *Chlorella* es cultivada a escala de laboratorio, en medios sintéticos, sin limitación de luz y/o nutrientes y en ausencia de un bombeo o flujo que les pueda generar estrés. Generalmente, durante la fase de crecimiento exponencial de estas microalgas, su superficie se encuentra cargada negativamente. Dicha carga es difícil de neutralizar por el proceso, lo que provoca que las microalgas crezcan como células individuales, proporcionando una elevada bioaccesibilidad

para su degradación. Sin embargo, una vez el cultivo alcanza la fase estacionaria y/o bajo condiciones de estrés, así como durante la fase de decadencia del proceso, dicha carga superficial negativa se reduce considerablemente, dando lugar a la floculación de las microalgas (Safi et al., 2014). Como puede verse en la Figura 4.13, los agregados formados alcanzan un tamaño incluso superior a las tétradas que conforman las *Scenedesmus*, lo cual incrementó su dificultad para ser degradadas por la biomasa anaerobia, ya que se reduce su bioaccesibilidad.

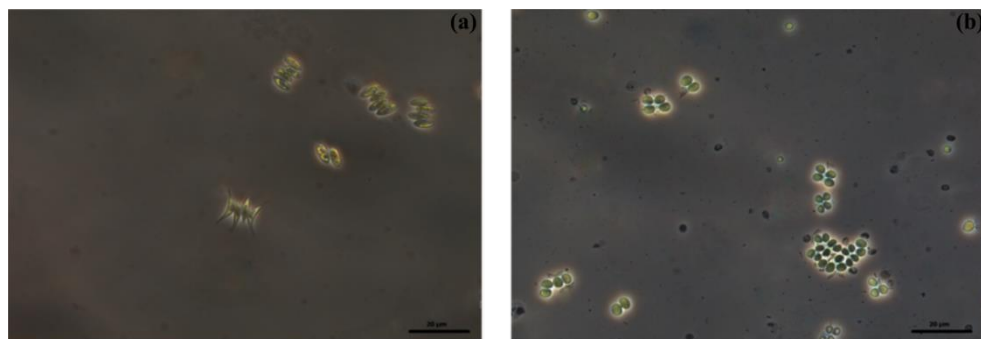


Figura 4.13. Imagen de las microalgas *Scenedesmus* spp. (a) y *Chlorella* spp. (b), cultivadas en la planta MPBR. La barra representa 20 μm .

Consecuentemente, se puede afirmar que la optimización del proceso de digestión anaerobia para maximizar la valorización de la biomasa algal depende en gran medida del tipo de microalga que se utilice como sustrato y de sus condiciones de cultivo, puesto que el género *Chlorella* spp. presenta una mayor resistencia que el género *Scenedesmus* spp. cuando se cultivan bajo condiciones de estrés pero no en ausencia de éstas.

Pese a la alta biodegradabilidad alcanzada en este periodo, según los resultados obtenidos en la presente tesis cabe esperar que ésta pueda incrementarse operando el reactor a un TRC más elevado, siempre y cuando los sólidos no superen el límite de operación de las membranas anaerobias.

4.2.3.5. Incremento del TRC en la digestión anaerobia de *Chlorella* spp.

En el periodo M-VI se procedió a incrementar el TRC de 100 a 140 días, manteniendo el resto de condiciones operacionales (Tabla 3.3), con el propósito de incrementar la eficiencia del proceso de degradación anaerobia de las microalgas pertenecientes al género *Chlorella* spp.

En este último periodo de estudio no se alcanzó el estado pseudo-estacionario ya que solo se operó durante 110 días, como puede verse en la Figura 4.9, Figura 4.10 y la Tabla 4.7. Sin embargo, en la Figura 4.11a se observa una clara tendencia ascendente en la producción de biogás, la cual incluso llega a superar la producción obtenida durante la digestión anaerobia de *Scenedesmus* spp. a 100 días de TRC (periodo M-IV). Esta producción de biogás alcanzó un caudal en las últimas semanas de operación de $1734.1 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$, incrementándose el rendimiento del proceso hasta $258.7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$, equivalente a un 73.9% de biodegradabilidad de la biomasa algal (Figura 4.11b, Tabla 4.9). De esta forma, se demuestra que la operación del reactor a altos tiempos de residencia mediante la tecnología AnMBR, es capaz de biometanizar sustratos de difícil degradación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta tecnología presenta ciertas limitaciones, puesto que un TRC muy alto puede exigir volúmenes de reacción muy elevados para mantener la concentración de sólidos en el módulo de membrana en valores razonables, que no generen una presión transmembrana inferior a la recomendada por el fabricante (-600 mbar).

En la Figura 4.14, en la que se muestran los valores de biodegradabilidad de la biomasa algal que se han obtenido para los distintos TRC estudiados, se observa que la eficiencia de biodegradación en el proceso se incrementa de forma rápida y casi lineal con el aumento del TRC, en el rango comprendido entre 50 y 100 días de TRC.

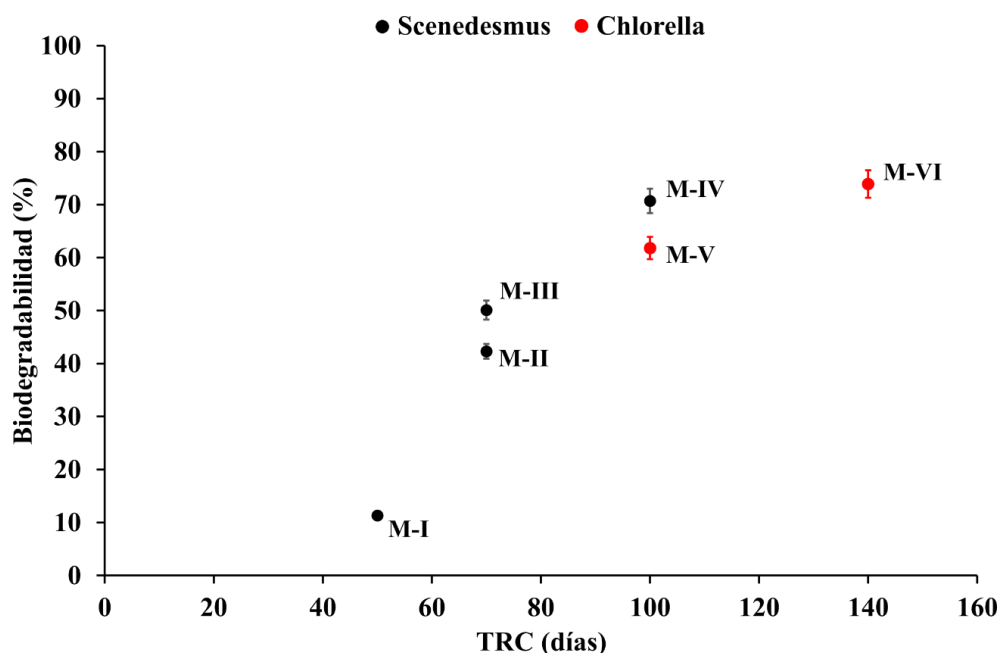


Figura 4.14. Evolución del rendimiento del proceso, en términos de eliminación de DQO, a medida que se incrementa el TRC, para cada periodo experimental estudiado.

Sin embargo, a partir de un TRC de 100 días, la eficiencia del proceso no exhibe un incremento tan acusado, lo que sugiere que: (i) mayores tiempos de residencia ya no darían lugar a un aumento tan acusado del rendimiento de producción de metano y (ii) que al no incrementarse sustancialmente la eliminación de DQO, se está produciendo una mayor acumulación de sólidos en el sistema. Esta mayor acumulación de sólidos podría dar lugar a un incremento de los costes energéticos de agitación en la membrana y de los costes asociados a su mantenimiento y limpieza. No obstante, son necesarios futuros estudios que confirmen la biodegradabilidad que se alcanza en el estado pseudo-estacionario del periodo con un TRC de 140 días, la reproducibilidad del estudio a escala piloto y la viabilidad económica del proceso global.

4.2.4. Sólidos en el reactor y fangos producidos

El incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal también puede evaluarse mediante la evolución de los sólidos en el reactor. La acumulación de sólidos en el sistema es un factor importante en la operación de un AnMBR, dado que las elevadas concentraciones de sólidos se encuentran directamente relacionadas con una mayor necesidad de limpieza y mantenimiento de las membranas, así como con un mayor consumo energético asociado a la recirculación de biogás para mantener agitado el sistema y reducir el *fouling* sobre la membrana (Moñino et al., 2017; Pretel et al., 2016a). Sin embargo, dado el elevado potencial hidrolítico del proceso biológico, es posible la operación del reactor a altos TRCs sin que se produzca un incremento sustancial de los sólidos en el sistema, siempre que el sustrato sea biodegradable y no presente una elevada fracción inerte en su composición.

En la Figura 4.15a se muestra la evolución de los sólidos totales, los sólidos volátiles y el porcentaje de sólidos volátiles durante toda la experimentación, mientras que en la Figura 4.15b se presentan la producción de fangos y el porcentaje de sólidos hidrolizados en cada periodo de estudio. Así mismo, en la Tabla 4.10 se muestra la media y desviación de los sólidos totales y sólidos volátiles en el reactor, producción de fangos y porcentaje de sólidos hidrolizados, calculados en el estado pseudo-estacionario de cada periodo experimental estudiado mediante la ecuación 3.14.

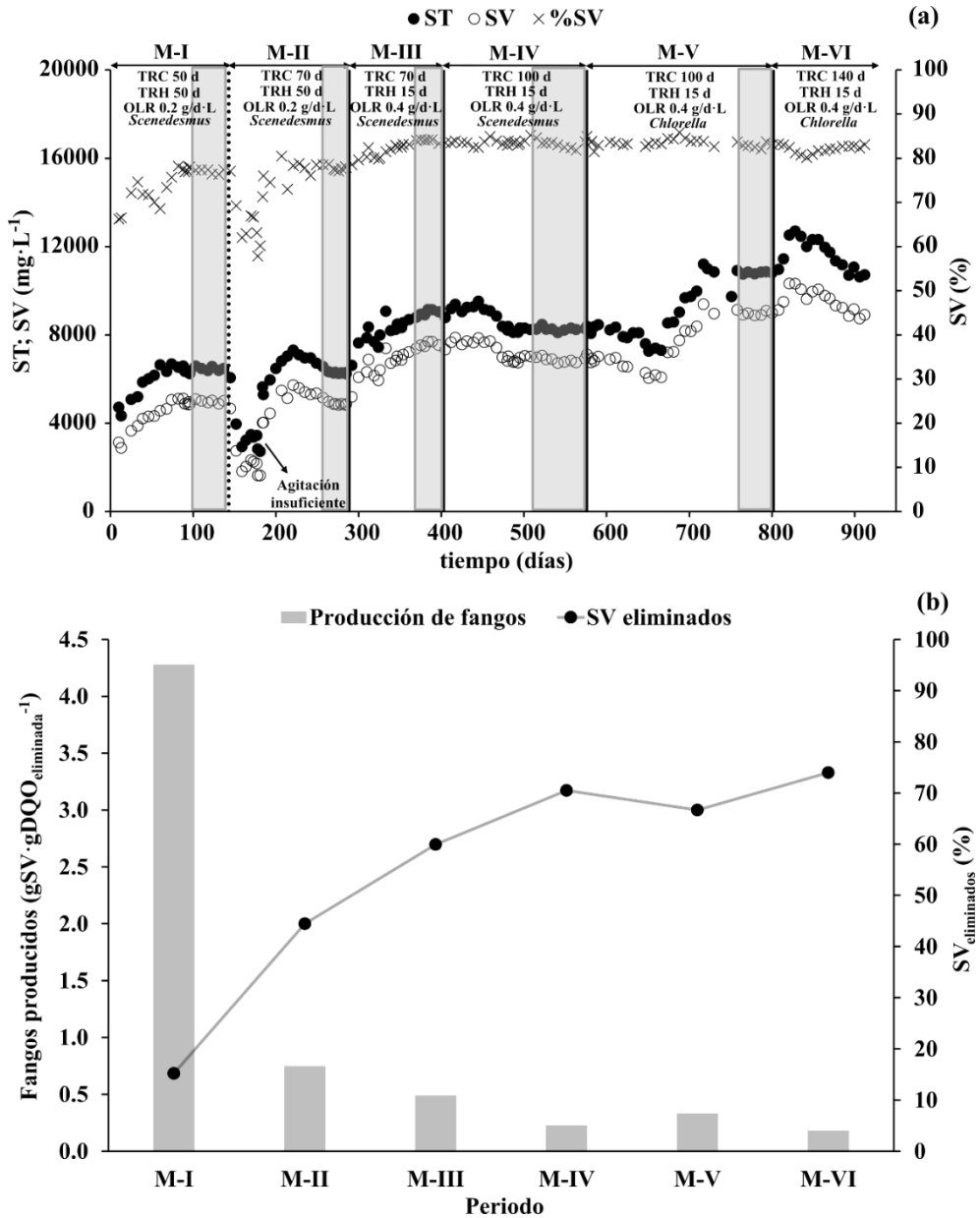


Figura 4.15. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles (a), y eliminación de SV y producción de fango (b) durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Como puede verse en la Figura 4.15a, tras un tiempo de puesta en marcha de tres meses, en el periodo M-I se alcanzó una concentración de sólidos totales de $6480 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, una de las más bajas obtenidas durante toda la experimentación. Sin embargo, el porcentaje de sólidos eliminados fue solo del 15.2%, lo que da lugar a la mayor producción de fangos obtenida en el presente estudio (Figura 4.15b, Tabla 4.10), asociada a la baja biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzada en este periodo (Tabla 4.9).

En cambio, en esta misma figura, puede observarse el claro efecto de incrementar el TRC de 50 a 70 días manteniendo una carga de $0.2 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ (periodo M-II) sobre la actividad hidrolítica del proceso, puesto que el aumento de la biodegradabilidad dio lugar a que los sólidos no solo no se incrementaran sino que alcanzaran una concentración de $6278 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ligeramente inferior a la resultante del periodo M-I en el estado pseudo-estacionario. Este resultado representa un incremento de los sólidos eliminados de hasta el 44.5%, y una reducción de la producción de fango desde 4.28 hasta $0.75 \text{ gSV}\cdot\text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ (Figura 4.15b, Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Sólidos totales y volátiles, producción de fango y sólidos eliminados en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios del reactor mesófilo, expresados como media \pm desviación estándar.

	ST_{reactor} (mg·L⁻¹)	SV_{reactor} (mg·L⁻¹)	Fango producido (gSV·gDQO_{eliminada}⁻¹)	SV_{eliminados} (%)
M-I	6480 ± 84	4993 ± 72	4.28 ± 0.02	15.2 ± 1.5
M-II	6278 ± 31	4870 ± 52	0.75 ± 0.05	44.5 ± 3.1
M-III	9033 ± 112	7588 ± 99	0.49 ± 0.03	59.9 ± 1.2
M-IV	8246 ± 101	6916 ± 119	0.23 ± 0.04	70.5 ± 2.3
M-V	10813 ± 43	8959 ± 77	0.33 ± 0.07	66.7 ± 6.6
M-VI⁽¹⁾	10855 ± 245	8978 ± 211	0.18 ± 0.09	74.0 ± 2.5

⁽¹⁾ Los cálculos de este periodo se realizaron en base a los valores obtenidos durante las últimas tres semanas de operación, puesto que no alcanzó el estado pseudo-estacionario.

En el caso del periodo M-III, el estudio realizado duplicando la OLR y manteniendo el TRC en 70 días, sí supuso un incremento de los sólidos en el reactor hasta 9033 mg·L⁻¹. Sin embargo, la mayor biodegradabilidad de la biomasa algal obtenida en este periodo, como consecuencia del incremento de la actividad hidrolítica del proceso, dio lugar a una producción de fango inferior a la del periodo M-II (Figura 4.15b, Tabla 4.10). Por el contrario, en el periodo M-IV, el incremento del TRC de 70 a 100 días manteniendo la OLR en 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹ no produjo un aumento de los sólidos en el reactor en comparación con el periodo M-III, debido a que la eliminación de sólidos se incrementó hasta 70.5%. Esta elevada hidrólisis de la biomasa algal resultó en una reducción de los ST hasta 8246 mg·L⁻¹ y una producción de fangos muy inferior a la obtenida en el periodo M-I, a pesar de que el reactor se operó con el doble de OLR y TRC (Figura 4.15a, Tabla 4.10).

En el periodo M-V se produjo un notable incremento de los sólidos en el reactor como consecuencia del cambio de microalga a biodegradar. No obstante, la producción de fango solo se incrementó de 0.23 a 0.33 gSV·gDQO_{eliminada}⁻¹ debido a la elevada actividad hidrolítica desarrollada en el sistema. El menor rendimiento del proceso biológico en este periodo se incrementó mediante la operación del reactor a un TRC de 140 días (Periodo M-VI). Pese a que este último periodo no cumple los criterios de estabilidad, la tendencia de los sólidos evidencia una mejora en la biodegradabilidad de la biomasa algal, ya que se alcanza una concentración de ST muy similar a la del periodo M-IV y muestra tanto la menor producción de fango de todo el periodo de experimentación como la mayor producción de biogás, calculados en base a las tres últimas semanas experimentales del periodo M-VI. Estos resultados corroboran que la operación de un digestor mesófilo a elevados TRC bajo la configuración AnMBR potencia la actividad hidrolítica de la biomasa anaerobia, dando lugar a mayores producciones de metano y menores producciones de fango.

En cuanto a la operación de la membrana de ultrafiltración empleada en la configuración AnMBR, el sucesivo incremento de los sólidos del reactor no afectó

en gran medida a su funcionamiento. Como puede verse en la Figura 4.16, la presión transmembrana no sufrió variaciones bruscas y se mantuvo lejos de los valores de riesgo suministrados por el fabricante (-600 mbar) en todo momento. Debido a la adecuada respuesta de la membrana, no fue necesario realizar ninguna limpieza química durante los 769 días que duró la experimentación con la configuración AnMBR.

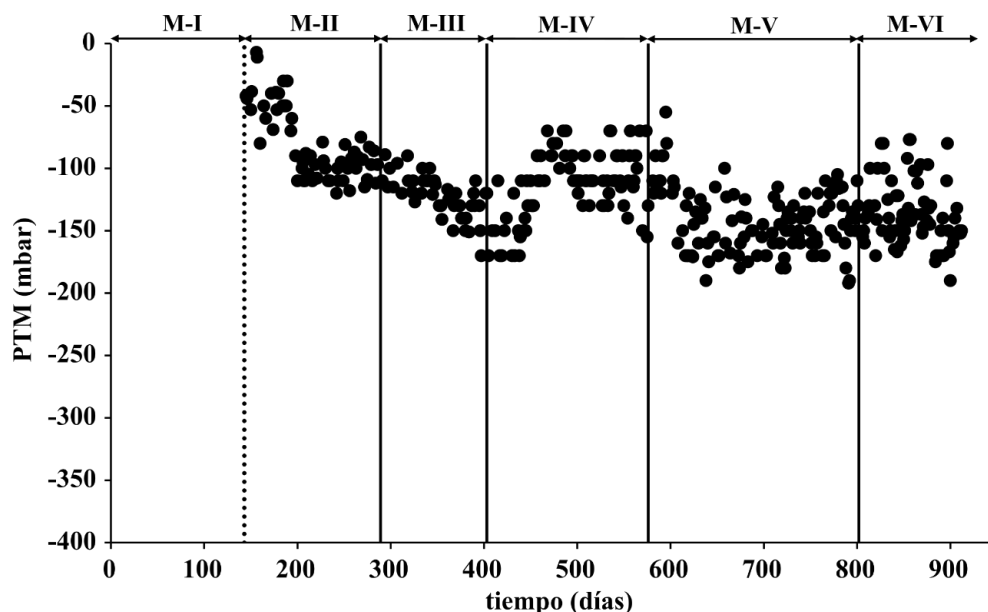


Figura 4.16. Evolución de la presión transmembrana (PTM) durante la operación del reactor mesófilo AnMBR. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

4.2.5. Calidad del efluente

La caracterización de las microalgas empleadas en la presente tesis (Tabla 4.5) mostró que esta biomasa presenta un alto contenido de nitrógeno y fósforo en su fracción particulada, por lo que se esperaba que se produjera una elevada liberación de NH_4^+ y PO_4^{3-} tras alcanzar elevados porcentajes de biodegradabilidad. En la Figura 4.17, donde se representa la evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato en el reactor mesófilo, se confirma que la biodegradación de las

microalgas produce un incremento en la concentración de estos nutrientes en el reactor, la cual es muy superior a la introducida con el alimento (Tabla 4.5).

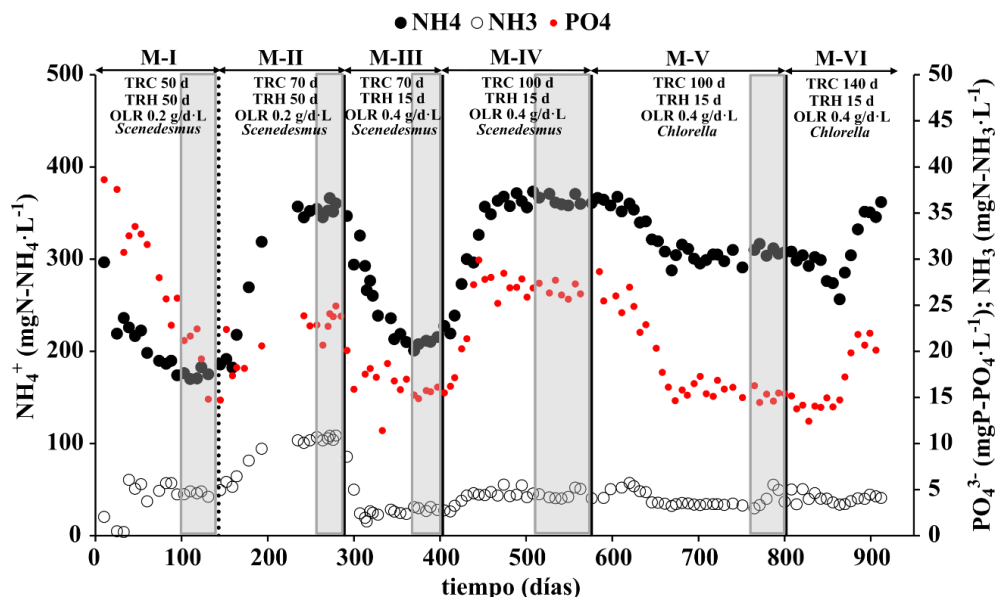


Figura 4.17. Evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

La elevada concentración de nitrógeno como consecuencia del alto contenido de proteínas de las microalgas *Scenedesmus* (Biller and Ross, 2014), podría dar lugar a la inhibición de la digestión anaerobia debido a una elevada presencia de amoníaco en el reactor. Sin embargo, en la Figura 4.17 se observa cómo la concentración de NH₃ se mantiene en todo momento lejos de las concentraciones inhibitorias de la actividad metanógena reportadas por varios estudios (Garcia and Angenent, 2009; Siles et al., 2010; Sung and Liu, 2003). A su vez, la baja concentración de AGV (Figura 4.8), en todo momento por debajo de 100 mg·L⁻¹ (Mara and Horan, 2003), confirma la ausencia de inhibición del proceso.

En la Tabla 4.11, en la que se muestra la caracterización del efluente del reactor en cada periodo estudiado, las fracciones totales (DQO_T , N_T y P_T) son el resultado del análisis de la corriente de purga, mientras que los componentes solubles (NH_4^+ , PO_4^{3-} y SO_4^{2-}) forman parte tanto de la corriente de purga como de la corriente de permeado en el caso de la configuración AnMBR. A su vez, en esta tabla se muestra el porcentaje de nitrógeno y fósforo solubilizados, calculados mediante la ecuación 4.3 y la ecuación 4.4 respectivamente.

$$\%N_{\text{solubilizado}} = \frac{NH_4^+_{\text{salida}} - NH_4^+_{\text{entrada}}}{N_{T\text{entrada}} - NH_4^+_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 4.3}]$$

$$\%P_{\text{solubilizado}} = \frac{PO_4^{3-}_{\text{salida}} - PO_4^{3-}_{\text{entrada}}}{P_{T\text{entrada}} - PO_4^{3-}_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad [\text{Ec. 4.4}]$$

En estas ecuaciones, los términos de entrada ($g \cdot d^{-1}$) se corresponden con las concentraciones de esos parámetros en la biomasa algal empleada como sustrato, mientras que los términos de salida ($g \cdot d^{-1}$) se corresponden con la corriente de purga y permeado en las configuraciones CSTR y AnMBR respectivamente.

Tabla 4.11. Caracterización del efluente del reactor mesófilo en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresados como media \pm desviación estándar.

	M-I	M-II	M-III	M-IV	M-V	M-VI ⁽²⁾
DQO _T (mgO ₂ ·L ⁻¹)	8822 \pm 20	8378 \pm 74	13299 \pm 74	11280 \pm 103	14561 \pm 48	14548 \pm 267
DQO _s (mgO ₂ ·L ⁻¹)	173.9 \pm 12.1	30.0 \pm 0.7	121.3 \pm 12.6	100.6 \pm 11.8	99.4 \pm 9.9	98.8 \pm 13
N _T (mgN·L ⁻¹)	686.4 \pm 13.2	658.3 \pm 32.3	907.5 \pm 24.8	812.0 \pm 45.3	1204.0 \pm 64.1	1300 \pm 43
P _T (mgP·L ⁻¹)	91.48 \pm 4.65	70.74 \pm 5.07	74.61 \pm 1.83	97.69 \pm 4.24	131.41 \pm 12.56	144.87 \pm 4.80
NH ₄ ⁺ (mgN·L ⁻¹)	174.97 \pm 5.17	357.61 \pm 6.93	211.22 \pm 3.22	365.07 \pm 6.59	309.18 \pm 4.58	352.40 \pm 6.83
NH ₃ (mgN·L ⁻¹)	4.58 \pm 0.24	10.65 \pm 0.22	2.89 \pm 0.20	4.71 \pm 0.55	4.07 \pm 0.98	4.20 \pm 0.20
PO ₄ ³⁻ (mgP·L ⁻¹)	19.85 \pm 3.06	23.86 \pm 0.79	14.69 \pm 1.51	27.19 \pm 0.82	15.26 \pm 0.66	20.92 \pm 0.94
SO ₄ ²⁻ (mgSO ₄ ·L ⁻¹)	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾
pH	7.34 \pm 0.06	7.40 \pm 0.03	7.04 \pm 0.03	7.01 \pm 0.04	7.09 \pm 0.09	7.01 \pm 0.02
N _{solubilizado} (%)	33.0 \pm 2.9	66.9 \pm 2.4	69.5 \pm 1.6	85.3 \pm 3.2	69.7 \pm 1.6	88.4 \pm 9.8
P _{solubilizado} (%)	10.6 \pm 3.1	18.6 \pm 1.6	22.5 \pm 2.3	36.3 \pm 4.1	13.5 \pm 1.4	30.2 \pm 3.7

⁽¹⁾ Valores inferiores al límite de detección.

⁽²⁾ Valores calculados con los datos obtenidos durante las 3 últimas semanas del periodo experimental.

Comparando los periodos M-I y M-II, en los cuales se alimentó la misma OLR, el notable aumento de la concentración de amonio en el M-II confirma la mayor biodegradabilidad alcanzada en este periodo (Figura 4.17), debido al incremento del TRC y el cambio de configuración realizados. Como puede verse en la Tabla 4.11, en ambas condiciones experimentales, el porcentaje de nitrógeno solubilizado excede al de biodegradabilidad, alcanzando 33.0% y 66.9% en el periodo M-I y M-II, respectivamente. Este fenómeno se repite en todos los periodos estudiados coincidiendo con el resultado obtenido por Adegbidi and Briggs (2003), quienes reportaron que la solubilización del nitrógeno es superior a la biometanización cuando se degradan sustratos con una baja relación C/N.

En el periodo M-III se produjo un descenso de la concentración de amonio desde 357.61 hasta 211.22 mg N-NH₄·L⁻¹, a pesar de que en este periodo se duplicó la carga y se alcanzó una mayor biodegradabilidad que en el periodo M-II. Esto se debe a que el incremento de la OLR se realizó descendiendo el TRH y la concentración de microalgas en el alimento simultáneamente (Tabla 4.5). A diferencia de la configuración CSTR, la mayor flexibilidad operacional que proporciona la tecnología de membranas permite incrementar la OLR con una corriente de microalgas más diluidas, sin necesidad de incrementar el volumen de reacción ni riesgo de que se produzca el lavado del reactor. El uso de microalgas más diluidas reduce tanto los costes asociados al proceso de concentración de la biomasa algal como el contenido de nitrógeno en el alimento. Por consiguiente, la concentración de amonio en el reactor también se reduce, junto con los posibles efectos inhibidores del proceso. Este hecho confirma que la operación de un reactor AnMBR a bajos TRHs reduce el riesgo de inhibición del proceso por amoniaco.

En los restantes periodos experimentales (M-IV, M-V y M-VI), el amonio en el reactor siguió la misma tendencia que la biodegradabilidad, incrementándose su concentración en los periodos de máxima biodegradabilidad (M-IV y M-VI) y descendiendo en el periodo M-V en el que la biodegradabilidad se redujo debido al

cambio del tipo de microalga. Por el contrario, no se apreciaron grandes variaciones en la concentración de NH_3 en estos periodos. Esto es debido a que el amoníaco, calculado mediante la ecuación 3.18, está fuertemente influenciado por el pH. Como puede verse en la Tabla 4.11, el valor del pH de los periodos M-III, M-IV, M-V y M-VI fue inferior a los de los periodos M-I y M-II, lo que mantuvo todavía más baja la concentración de NH_3 en el reactor.

En cuanto a la evolución de la concentración de fosfato en el reactor, ésta sigue una tendencia similar al amonio (Figura 4.17). Sin embargo, los valores alcanzados de concentración, y por tanto de solubilización, fueron inferiores a los esperados según la caracterización mostrada en la Tabla 4.5. La baja concentración de fosfato en el efluente sugirió que estaba teniendo lugar la precipitación de fósforo en el interior del reactor, por lo que se decidió analizar los cationes en el alimento y en el efluente del mismo. El análisis de cationes mediante cromatografía iónica reveló que el contenido en calcio era un 21% inferior en la salida del reactor que en el alimento, confirmando así que la precipitación de fósforo estaba produciéndose. Además, esto pudo corroborarse cuando el reactor fue desmontado, una vez terminada la experimentación. En la Figura 4.18, se muestran dos imágenes del precipitado encontrado en el interior del reactor mesófilo. El análisis de este precipitado, mediante espectrofotometría, tras una digestión ácida (métodos 4500-P-B y 4500-P-F. APHA, 2012), reveló un contenido de fosfato de 128 mg P-PO_4 por cada gramo de precipitado.

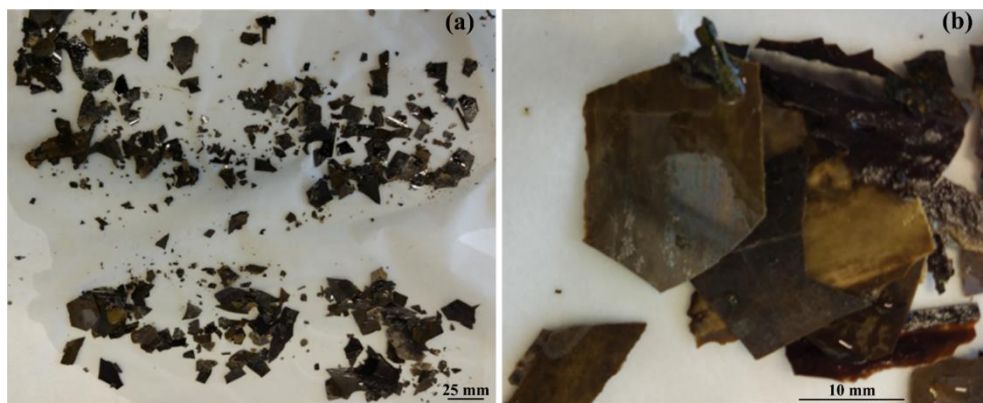


Figura 4.18. Imágenes del precipitado extraído del interior del reactor mesófilo (a) y detalle ampliado del mismo (b), una vez terminada la experimentación.

Como muestra la Tabla 4.11, el uso de la configuración AnMBR para la digestión anaerobia de microalgas da lugar a un permeado de alta calidad. Dicho permeado destaca por la baja concentración de DQO soluble, la cual es inferior al límite de vertido exigido por la legislación vigente, y por la ausencia de sólidos y patógenos gracias al uso de una membrana de ultrafiltración. Esta alta calidad junto con su elevado contenido en amonio y fosfato, convierten a esta corriente en una fuente de recursos a partir de la cual se pueden recuperar los nutrientes. Existen distintas estrategias para recuperar estos nutrientes, entre las que destacan las siguientes:

- Fertilizante sólido. Los nutrientes pueden ser recuperados de la corriente ya sea mediante precipitación en forma de carbonatos, o bien mediante cristalización en forma de estruvita, siempre y cuando se evite la precipitación incontrolada de fósforo en el interior del reactor (Martí et al., 2010). La obtención de fertilizante sólidos como subproducto mejoraría el balance económico del proceso.
- Fertilizante líquido. La corriente puede ser utilizada directamente como agua de riego, pues constituye un fertilizante natural (Zamalloa et al., 2012b). Así mismo, puede ser reutilizada para el cultivo de nueva biomasa algal (Mo and Zhang, 2013; Wang and Park, 2015), lo cual permitiría obtener un efluente

depurado y una biomasa que permitiría incrementar posteriormente la producción de biogás u obtener productos de valor añadido como los bioplásticos.

Igualmente, la corriente de fango tiene un alto contenido en nitrógeno y fósforo (Tabla 4.11), por lo que podría ser reutilizada como biofertilizante agrícola tras su deshidratación.

Reutilización del permeado del reactor AnMBR para el cultivo de microalgas

El permeado del reactor AnMBR fue empleado para cultivar nueva biomasa algal, con el fin de comprobar que esta corriente es adecuada para la producción de microalgas. Para ello, se llevó a cabo un experimento de 20 días de duración en un fotobiorreactor (FBR) a escala de laboratorio, el cual se muestra en la Figura 4.19. El FBR empleado es un reactor abierto a la atmósfera, cuyo volumen total es de 10 L y el volumen de trabajo de 4 L. Este reactor fue sembrado con 0.5 L de microalgas procedentes de la planta piloto MPBR, añadidos sobre un volumen de permeado de 3.5 L. Una vez sembrado, el reactor se mantuvo iluminado constantemente mediante 8 tubos de luces LED de color blanco frío y blanco neutro, dispuestos de forma alternada (T8 900mm 220-240V 50-60Hz, Philips). La homogenización del FBR se realizó mediante recirculación de aire, lo cual también proporciona carbono inorgánico en forma de CO_2 al cultivo, siendo el pH monitorizado pero no controlado. La alimentación y purga se realizó de forma diaria, purgando 500 mL al día y alimentando el mismo volumen de permeado del AnMBR, manteniendo así el TRH en 8 días. Periódicamente se analizaron sólidos suspendidos totales, amonio, fosfato, nitrito y nitrato para seguir la evolución del reactor. El nitrito y nitrato fueron medidos según los métodos 4500N- NO_2 B y 4500N- NO_3 E del *Standard Methods* (APHA, 2012) respectivamente.

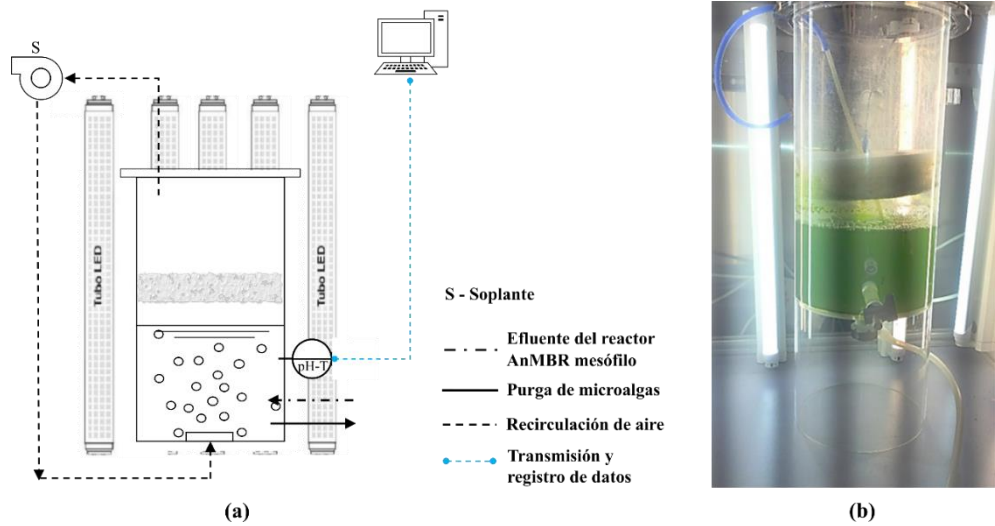


Figura 4.19. Esquema (a) y vista general (b) del fotobiorreactor para el cultivo de microalgas en el permeado del rector AnMBR.

En la Figura 4.20, en la cual se muestra la evolución de los sólidos y de la concentración de ambos nutrientes en el FBR, puede observarse cómo se incrementan rápidamente los sólidos en el sistema, alcanzando una concentración de $1350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ transcurridos 19 días de experimentación (Figura 4.20a).

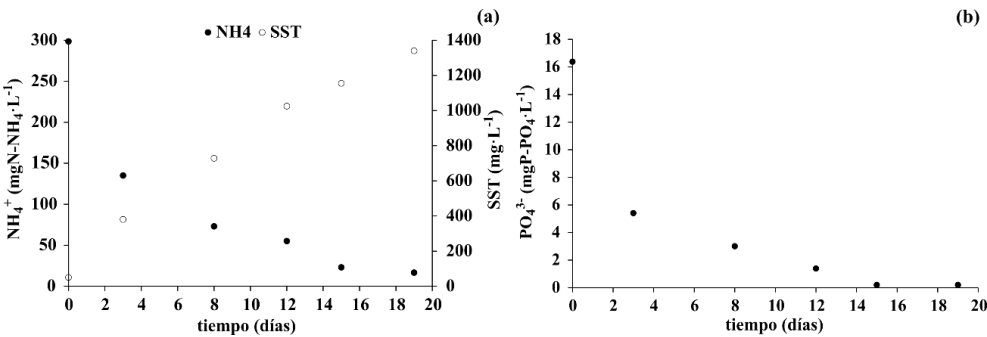


Figura 4.20. Evolución de los SST y amonio (a) y del fosfato (b) en el FBR a escala de laboratorio alimentado con el permeado del AnMBR mesófilo.

Este incremento de los sólidos denota el crecimiento de las microalgas, las cuales se caracterizaron por el predominio de *Chlorella* spp. Dicho desarrollo de la biomasa

algal se confirma con la elevada eliminación de nutrientes, debido a su consumo por parte de las microalgas. En la Figura 4.20a puede verse que el amonio descendió considerablemente durante los tres primeros días de operación, desde 299.80 ± 1.37 hasta 135.00 ± 2.15 mg $\text{N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, consumiéndose el 55.0% del nitrógeno amoniacal. Este brusco descenso inicial ha sido también detectado por otros autores, quienes lo relacionan con la fase de rápido crecimiento en la que se encuentra la biomasa algal al inicio de la experimentación (Liu et al., 2017). Tras este periodo inicial, la velocidad de consumo de amonio se estableció en 4.01 mg $\text{N-NH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$, alcanzándose una concentración de 18.03 ± 0.25 mg $\text{N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ al final del experimento, correspondiente a un 94.0% de eliminación de amonio. La ausencia de nitrito y nitrato durante todo el experimento corroboró que el consumo de amonio fue llevado a cabo por las microalgas, y no por el crecimiento de bacterias amonioxidas.

Así mismo, en la Figura 4.20b se observa que el fosfato siguió una tendencia similar a la del amonio, reduciéndose su concentración en un 67.0% durante los 3 primeros días de experimentación, desde 16.38 ± 0.95 hasta 5.41 ± 0.12 mg $\text{P-PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$. Posteriormente, la velocidad de consumo de fosfato se estableció en 0.21 mg $\text{P-PO}_4 \cdot \text{d}^{-1}$ dando lugar a una concentración de 0.20 ± 0.03 mg $\text{P-PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ al final de la experimentación y a una eliminación de fosfato del 98.7%.

Los elevados porcentajes de eliminación de nutrientes obtenidos, coinciden con los previamente reportados en otros estudios para *Chlorella vulgaris* (Caporgno et al., 2015a; Markou, 2015). De esta forma, se puede afirmar que la corriente de permeado procedente de un AnMBR, empleado para la digestión anaerobia de microalgas, es apropiada para ser recirculada al cultivo de biomasa algal, la cual puede ser empleada para aumentar la producción de biogás o para la obtención de subproductos tales como los bioplásticos.

4.2.6. Conclusiones de la digestión anaerobia de microalgas en condiciones mesófilas

El estudio de digestión anaerobia de microalgas en continuo, a 35°C de temperatura, corroboró tanto la elevada resistencia de las microalgas a la degradación biológica como la necesidad de establecer una elevada actividad hidrolítica para maximizar la eficiencia del proceso. Así pues, se confirmó que la actividad hidrolítica de la propia biomasa anaerobia puede ser incrementada combinando la operación del reactor a elevados TRCs con el uso de la tecnología de membranas como sistema físico de separación, puesto que se consiguió alcanzar una biodegradabilidad de *Scenedesmus* spp. del 70.9% y de *Chlorella* spp. 73.9% sin aplicar pretratamientos, siendo ambas muy superiores a las reportadas por otros autores hasta el momento. Operar el reactor a un elevado TRC promueve el desarrollo de microorganismos con baja tasa de crecimiento, fomentando su adaptación a este tipo de sustrato, incrementando la biodiversidad microbiana y, por tanto, potenciando notablemente la actividad hidrolítica del proceso. A su vez, la flexibilidad operacional que proporciona la tecnología de membranas permite trabajar a elevados TRC y altos caudales de tratamiento sin necesidad de incrementar el volumen de reacción, así como alimentar corrientes de microalgas más diluidas sin riesgo de lavar el reactor.

Así mismo, se comprobó que tanto el tipo de microalga como sus condiciones de cultivo afectan significativamente a su biodegradabilidad, siendo necesario optimizar las condiciones operacionales en función de las microalgas empleadas como sustrato.

La elevada actividad hidrolítica alcanzada dio lugar a que se redujera en gran medida la producción de fango, y por tanto los costes asociados a su posterior tratamiento, siendo los valores más bajos obtenidos de 0.23 y 0.18 gSV·gDQO_{eliminada}⁻¹ para *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp. respectivamente. Además, esta elevada eliminación de sólidos permite que el reactor pueda ser operado a elevados TRCs sin que se produzca un desmesurado incremento de los sólidos, reduciendo así la

necesidad de limpieza de la membrana o la necesidad de grandes volúmenes de reacción.

El efluente exhibió una alta concentración de amonio, siendo mayor el nitrógeno solubilizado que la biodegradabilidad alcanzada debido al elevado contenido de nitrógeno de la biomasa algal. Sin embargo, pese a la elevada concentración de amonio, la ausencia de AGV acumulados y el elevado rendimiento del proceso denotaron que la inhibición por amoníaco no tuvo lugar. Esto se debe a que la tecnología de membranas permite incrementar la OLR disminuyendo a su vez la concentración de microalgas en el alimento, lo que reduce la concentración de posibles inhibidores tales como el amoníaco o los compuestos intermedios producidos durante la digestión anaerobia, así como los costes asociados al proceso de concentración de microalgas.

Consecuentemente, se ha demostrado que la configuración AnMBR es una alternativa tecnológica viable para operar el reactor a elevados TRCs y caudales de tratamiento, permitiendo alimentar microalgas más diluidas, sin incrementar el volumen de reacción y obteniendo un efluente de elevada calidad, susceptible de ser reutilizado para el cultivo de nueva biomasa algal o la recuperación de nutrientes, siempre y cuando se evite la precipitación incontrolada de fósforo en el interior del reactor.

El resultado obtenido sugiere que deberían realizarse futuros estudios en relación al escalado a planta piloto del proceso, así como en cuanto a su evaluación económica en un ciclo integrado que abarque desde el tratamiento anaerobio del agua residual y el post-tratamiento mediante el cultivo de microalgas, hasta la revalorización energética de dichas microalgas en forma de biogás mediante digestión anaerobia.

4.3. Digestión anaerobia de la biomasa algal en condiciones termófilas

La digestión anaerobia de microalgas en condiciones termófilas se realizó con el fin de intentar incrementar la producción de metano, en comparación con la obtenida en un reactor AnMBR mesófilo o tras un pretratamiento enzimático, así como para evaluar cómo afecta el elevado contenido de nitrógeno de las microalgas al proceso biológico operado a 55°C de temperatura.

La experimentación tuvo una duración total de 900 días, los cuales pueden dividirse en seis periodos (Tabla 3.4, Pág. 104), en los que se estudiaron tres TRCs distintos (50, 70 y 35 días) y tres OLR (0.2, 0.4 y 0.3 g·d⁻¹·L⁻¹) para poder evaluar el efecto de modificar la OLR con un TRC constante (periodos T-I, T-II y T-III), así como el efecto de modificar el TRC manteniendo la velocidad de carga orgánica (T-III, T-IV y T-V). En el último periodo (T-VI), se llevó a cabo un incremento progresivo de la OLR para evaluar la respuesta del proceso ante la elevada presencia de amoníaco. Posteriormente, se realizó un estudio de inhibición en *batch* para estimar el grado de inhibición que alcanzó el proceso.

4.3.1. Caracterización de las microalgas empleadas como sustrato

De la misma forma que en el reactor mesófilo, se realizó una caracterización exhaustiva de la biomasa algal empleada como sustrato de la digestión anaerobia termófila, ya que el conocimiento de los distintos componentes permite evaluar el potencial de biometanización de las microalgas alimentadas, realizar el balance de DQO para identificar el estado pseudo-estacionario y estimar el grado de solubilización de nutrientes que ocurre durante la degradación.

La Tabla 4.12 muestra dicha caracterización de las microalgas en 5 de los 6 periodos estudiados, en los cuales se alcanzó el estado pseudo-estacionario, siendo establecida la concentración de microalgas en base a su DQO, mientras que en la Tabla 4.13 se

muestra la caracterización de las distintas OLR empleadas en el periodo T-VI para evaluar la capacidad de tratamiento del proceso biológico.

Tabla 4.12. Caracterización de la biomasa algal alimentada al reactor termófilo en los periodos en los que se alcanzó el estado pseudo-estacionario. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Periodo	T-I	T-II	T-III	T-IV	T-V
DQO _T (mgO ₂ ·L ⁻¹)	9991 \pm 297	19935 \pm 114	14938 \pm 145	19948 \pm 287	9958 \pm 91
DQOs (mgO ₂ ·L ⁻¹)	195.8 \pm 77.6	121.7 \pm 53.2	176.0 \pm 35.2	186.1 \pm 76.2	80.8 \pm 10.9
SST (mgSST·L ⁻¹)	6715 \pm 272	13130 \pm 392	9969 \pm 102	13216 \pm 195	6964 \pm 229
SSV (mgSSV·L ⁻¹)	5714 \pm 178	11697 \pm 314	8625 \pm 97	11882 \pm 177	6111 \pm 142
N _T (mgN·L ⁻¹)	548.9 \pm 63.3	1083.9 \pm 40.4	858.2 \pm 15.4	1068.2 \pm 87.1	718.3 \pm 25.3
Ns (mgN·L ⁻¹)	63.2 \pm 2.9	70.6 \pm 10.9	61.6 \pm 3.4	43.0 \pm 7.9	65.2 \pm 11.6
P _T (mgP·L ⁻¹)	76.47 \pm 9.36	191.73 \pm 10.37	90.15 \pm 3.35	137.40 \pm 2.63	72.27 \pm 3.52
NH ₄ ⁺ (mgN·L ⁻¹)	29.55 \pm 12.96	24.46 \pm 17.31	35.51 \pm 11.40	16.80 \pm 7.05	43.21 \pm 2.75
PO ₄ ³⁻ (mgP·L ⁻¹)	7.65 \pm 2.57	10.32 \pm 1.41	14.56 \pm 3.82	9.83 \pm 3.00	9.72 \pm 1.84
SO ₄ ²⁻ (mgSO ₄ ·L ⁻¹)	197.62 \pm 10.17	268.21 \pm 33.11	169.59 \pm 8.63	270.35 \pm 34.06	353.84 \pm 63.08
AGV (mgCH ₃ COOH·L ⁻¹)	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾
ALK (mgCaCO ₃ ·L ⁻¹)	452.25 \pm 73.15	503.94 \pm 113.21	389.20 \pm 29.46	654.70 \pm 102.05	459.02 \pm 87.50
pH	7.16 \pm 0.13	7.20 \pm 0.04	7.23 \pm 0.06	7.42 \pm 0.07	7.25 \pm 0.06
Microalga (spp.) predominante (%especie)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)	<i>Scenedesmus</i> (>90%)

⁽¹⁾ Valores inferiores al límite de detección.

Tabla 4.13. Caracterización de la biomasa algal en cada OLR alimentada al reactor termófilo en el periodo T-VI, presentada como media \pm desviación estándar.

Periodo	T-VI				
OLR ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.4	0.6	0.8	0.9	1.0
DQO _T ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	14664 \pm 281	20360 \pm 125	28021 \pm 246	30900 \pm 231	34700 \pm 217
DQOs ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	147.2 \pm 33.1	82.7 \pm 26.2	146.9 \pm 90.8	171.6 \pm 67.2	125.3 \pm 37.1
SST ($\text{mg SST}\cdot\text{L}^{-1}$)	11740 \pm 324	12650 \pm 206	18563 \pm 137	14177 \pm 221	14177 \pm 189
SSV ($\text{mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$)	10293 \pm 254	12290 \pm 198	17269 \pm 205	13592 \pm 206	13592 \pm 206
N _T ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	964.0 \pm 53.8	1440.0 \pm 37.6	1860.8 \pm 62.7	1920.1 \pm 31.1	2032.1 \pm 42.8
N _s ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	89.5 \pm 7.6	28.0 \pm 5.2	32.9 \pm 4.6	56.0 \pm 7.3	43.0 \pm 5.6
P _T ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	110.63 \pm 1.76	180.45 \pm 3.25	231.04 \pm 7.80	324.14 \pm 6.51	480.59 \pm 10.21
NH ₄ ⁺ ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	61.72 \pm 13.06	24.71 \pm 3.6	29.19 \pm 2.89	16.99 \pm 5.25	37.70 \pm 8.22
PO ₄ ³⁻ ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	8.51 \pm 0.94	2.29 \pm 0.26	3.40 \pm 0.72	5.23 \pm 0.81	3.45 \pm 1.25
SO ₄ ²⁻ ($\text{mg SO}_4\cdot\text{L}^{-1}$)	271.20 \pm 26.82	268.39 \pm 32.15	321.09 \pm 33.94	191.28 \pm 45.10	287.26 \pm 42.15
AGV ($\text{mgCH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$)	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾
ALK ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	327.55 \pm 36.20	455.22 \pm 75.41	426.17 \pm 63.20	387.21 \pm 83.33	492.55 \pm 62.75
pH	7.41 \pm 0.09	7.37 \pm 0.06	7.40 \pm 0.05	7.42 \pm 0.11	7.38 \pm 0.09
Microalga (spp.) predominante (%especie)	<i>Chlorella</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)	<i>Chlorella</i> (>90%)
Duración ⁽²⁾ (días)	22	24	27	18	20

⁽¹⁾ Valores inferiores al límite de detección.

⁽²⁾ Tiempo en el que se estuvo alimentando cada una de las cargas.

En la caracterización mostrada en estas tablas, la baja DQOs en comparación con la DQO_T confirma que la materia orgánica de la biomasa algal se encuentra principalmente en la fracción particulada. Así pues, otra de las alternativas para potenciar la hidrólisis de esta biomasa algal es llevar a cabo su digestión anaerobia en condiciones termófilas, ya que los microorganismos termófilos presentan una

mayor actividad hidrolítica que los mesófilos, pudiendo dar lugar a una mayor producción de biogás (Song et al., 2004; Sung and Santha, 2001). Sin embargo, los estudios de biodegradabilidad anaerobia de microalgas a elevada temperatura no son tan abundantes como los realizados bajo condiciones mesófilas, dado que son proclives a la inhibición (Olsson et al., 2014). Esto es debido a la relación de nutrientes en las microalgas, la cual se muestra en la Tabla 4.14 y es similar a la obtenida en el influente del reactor mesófilo (Tabla 4.6, Pág. 155).

Tabla 4.14. Relación molar media de nitrógeno y fósforo con respecto a la materia orgánica, presente en la fracción particulada de las microalgas alimentadas al CSTR termófilo. Porcentaje medio que representan estos nutrientes de los sólidos suspendidos de la biomasa algal.

Periodo	N/DQO	N/SST (%)	P/DQO	P/SST (%)
T-I	0.05	7.23	0.003	0.95
T-II	0.05	7.72	0.005	1.34
T-III	0.06	7.99	0.003	0.76
T-IV	0.06	7.76	0.003	0.97
T-V	0.07	9.39	0.003	0.90

Durante la digestión anaerobia, el alto contenido en nitrógeno de las microalgas (Tabla 4.14) da lugar a la liberación de elevadas concentraciones de amonio, tal y como se observó en el estudio realizado en condiciones mesófilas. Además, el elevado contenido en nitrógeno del influente cobra relevancia debido a que la temperatura de operación del reactor termófilo (55°C) tiene una elevada influencia sobre el equilibrio $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, el cual se ve desplazado hacia la forma no ionizada (Ec. 3.18) y puede dar lugar a la inhibición del proceso por amoníaco (Siles et al., 2010).

Así mismo, esta posible inhibición por amoníaco puede verse potenciada debido a la elevada concentración de las microalgas en el alimento. Dado que el volumen del

reactor es fijo, la OLR alimentada solo puede ser modificada mediante la variación del caudal alimentado o la concentración de microalgas en dicho influente, tal y como se muestra en la ecuación 4.5,

$$OLR = \frac{[DQO] \cdot Q}{V_{reacción}} \quad [Ec. 4.5]$$

donde $[DQO]$ es la concentración de DQO de las microalgas alimentadas ($g \cdot L^{-1}$), Q es el caudal de microalgas influente al reactor ($L \cdot d^{-1}$) y $V_{reacción}$ (L) es el volumen de trabajo de reactor CSTR termófilo. Sin embargo, la variación del caudal (Q) también afecta directamente al TRC ya que no se utiliza membrana y, por tanto, no se independiza el TRC del TRH, como puede observarse en la siguiente ecuación:

$$TRC = TRH = \frac{V_{reacción}}{Q} \quad [Ec. 4.6]$$

Por ello, dado que el volumen de reacción es constante, para mantener un TRC determinado, la modificación de la OLR solo puede hacerse mediante la variación de la concentración de DQO en el influente. Así mismo, la modificación del caudal alimentado para variar el TRC, deberá ir acompañada de una modificación de la concentración de microalgas en el alimento si se desea mantener la OLR.

Esta baja flexibilidad operacional asociada al uso de una configuración CSTR, implica que la alimentación al reactor termófilo debe hacerse con una mayor concentración de microalgas (Tabla 4.12) que al reactor mesófilo (Tabla 4.5), incluso cuando su operación se realiza a menor TRC y OLR, lo cual puede afectar a su estabilidad.

4.3.2. Identificación de los periodos pseudo-estacionarios

El estado pseudo-estacionario para cada uno de los periodos estudiados, viene definido por la estabilidad que exhiben los parámetros que caracterizan el proceso

biológico, como son los sólidos en el reactor, la producción de biogás y la ausencia de acumulación de materia en el balance de DQO, siguiendo así el mismo criterio establecido en el estudio realizado en condiciones mesófilas.

La Figura 4.21, en la que se representa la evolución de los sólidos en el reactor a lo largo de toda la experimentación, las zonas sombreadas muestran los intervalos identificados como estables dentro de cada periodo de estudio.

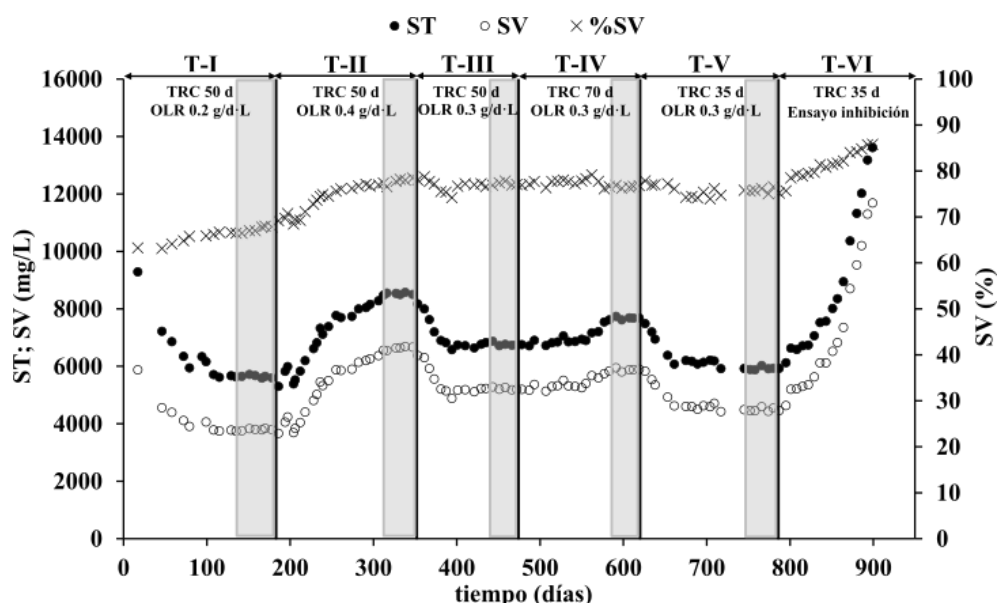


Figura 4.21. Evolución de los sólidos totales, volátiles y del porcentaje de sólidos volátiles en el reactor CSTR termófilo. Las zonas sombreadas representan los estados pseudo-estacionarios identificados en cada periodo experimental.

El balance de materia aplicado a este reactor se realizó mediante la ecuación 3.3, en la que se tienen en cuenta la DQO de las tres corrientes presentes en un CSTR: (i) la DQO de las microalgas en la corriente de alimento, (ii) la DQO del metano presente en el biogás producido y la consumida por las bacterias SRB y (iii) la DQO correspondiente al fango purgado, siendo la suma de la DQO de (ii) y (iii) el equivalente a la DQO de salida del reactor. En cuanto al término de acumulación de

materia, éste debe ser nulo cuando el sistema se encuentra en estado estacionario. Así pues, análogamente al reactor mesófilo, se ha considerado que el proceso es estable cuando dicha acumulación es inferior a un 5% con respecto la DQO de entrada.

El balance de DQO realizado para cada uno de los estados pseudo-estacionarios, identificados en base a la estabilidad de los sólidos (Figura 4.21), se muestra en la Figura 4.22. En esta figura se representa la DQO de la corriente influente junto con la DQO de salida del reactor, constituida por la suma de las distintas fracciones que la componen.

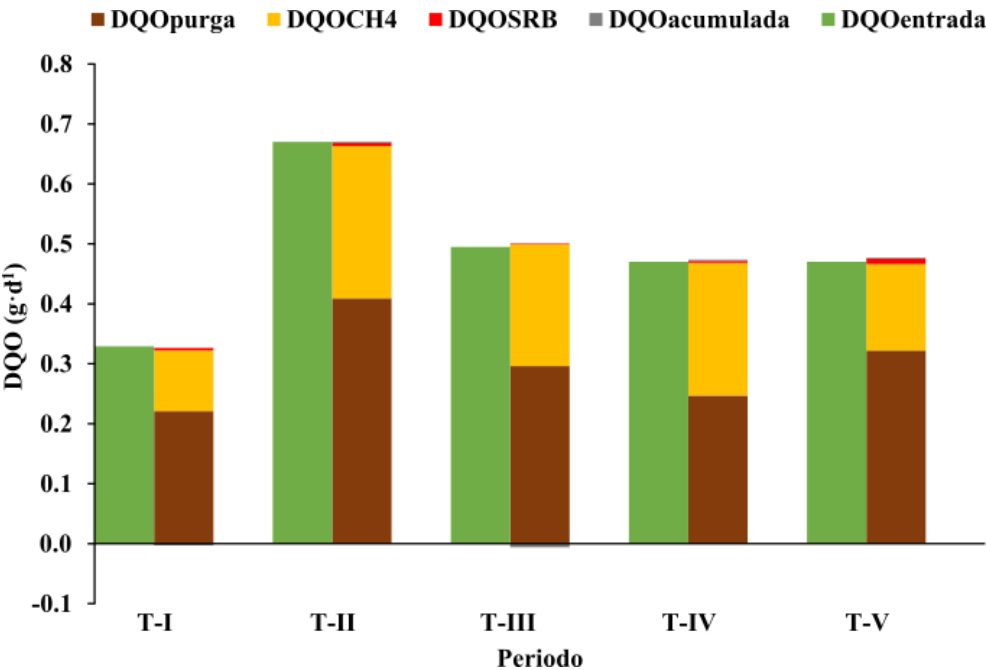


Figura 4.22. Balance de materia orgánica en términos de DQO, realizado en el reactor CSTR termófilo para los estados pseudo-estacionarios identificados dentro de cada periodo experimental.

Como puede verse en la Figura 4.22, la barra que representa el término de la DQO alimentada al reactor, se corresponde con la suma de los términos que representan la

salida del mismo para cada uno de los periodos experimentales. Esto indica que el balance de materia orgánica se cierra con un bajo porcentaje de error, tal y como puede apreciarse en la Tabla 4.15. Además, en esta misma figura se demuestra la estabilidad del proceso en cada periodo estacionario seleccionado ya que el término de acumulación es despreciable (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Porcentaje de error en el balance de materia y de la DQO acumulada en cada periodo del CSTR termófilo en el que se alcanzó el estado pseudo-estacionario.

Periodo	%Error_{Balance} ⁽¹⁾	%DQO_{Acumulada} ⁽²⁾
T-I	1.70	-0.91
T-II	-0.07	0.27
T-III	0.14	-1.23
T-IV	-0.74	0.38
T-V	-1.51	0.36

⁽¹⁾ Calculado mediante la ecuación 3.10 (pág. 112).

⁽²⁾ Calculado mediante la ecuación 3.11 (pág. 112).

Cabe destacar que el periodo T-VI no exhibe estabilidad dado que forma parte de un estudio de inhibición, consistente en el incremento progresivo de la OLR alimentada al reactor con el propósito de conocer la respuesta del proceso ante la elevada presencia de amoníaco.

4.3.3. Efecto de las condiciones operacionales sobre la biodegradabilidad anaerobia

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de la digestión anaerobia de microalgas en condiciones termófilas (55°C), llevada a cabo en un reactor CSTR a escala de laboratorio. A partir de estos resultados, se estudia la influencia de la temperatura en comparación con los resultados obtenidos del reactor mesófilo, el tiempo de retención celular y la velocidad de carga orgánica sobre la

biodegradabilidad de las microalgas, con el propósito de maximizar la producción de metano y minimizar los posibles problemas de inhibición por amoníaco.

En este caso, evaluar la influencia de los distintos parámetros es de especial importancia debido a la presencia de amoníaco en el sistema, puesto que elevadas concentraciones de este compuesto en el reactor pueden dar lugar a la desestabilización del proceso e incluso a la inhibición del mismo, limitando así el potencial de biodegradación de la biomasa algal.

La Figura 4.23 muestra la evolución de distintos parámetros durante los 900 días de experimentación en el reactor CSTR termófilo: la producción de biogás y el porcentaje de metano que lo constituye (Figura 4.23a), la concentración de amonio y amoníaco en el reactor (Figura 4.23b) y la concentración AGV y alcalinidad (Figura 4.23c). Así mismo, la Figura 4.24 muestra la producción de metano y la DQO eliminada en los periodos de estudios.

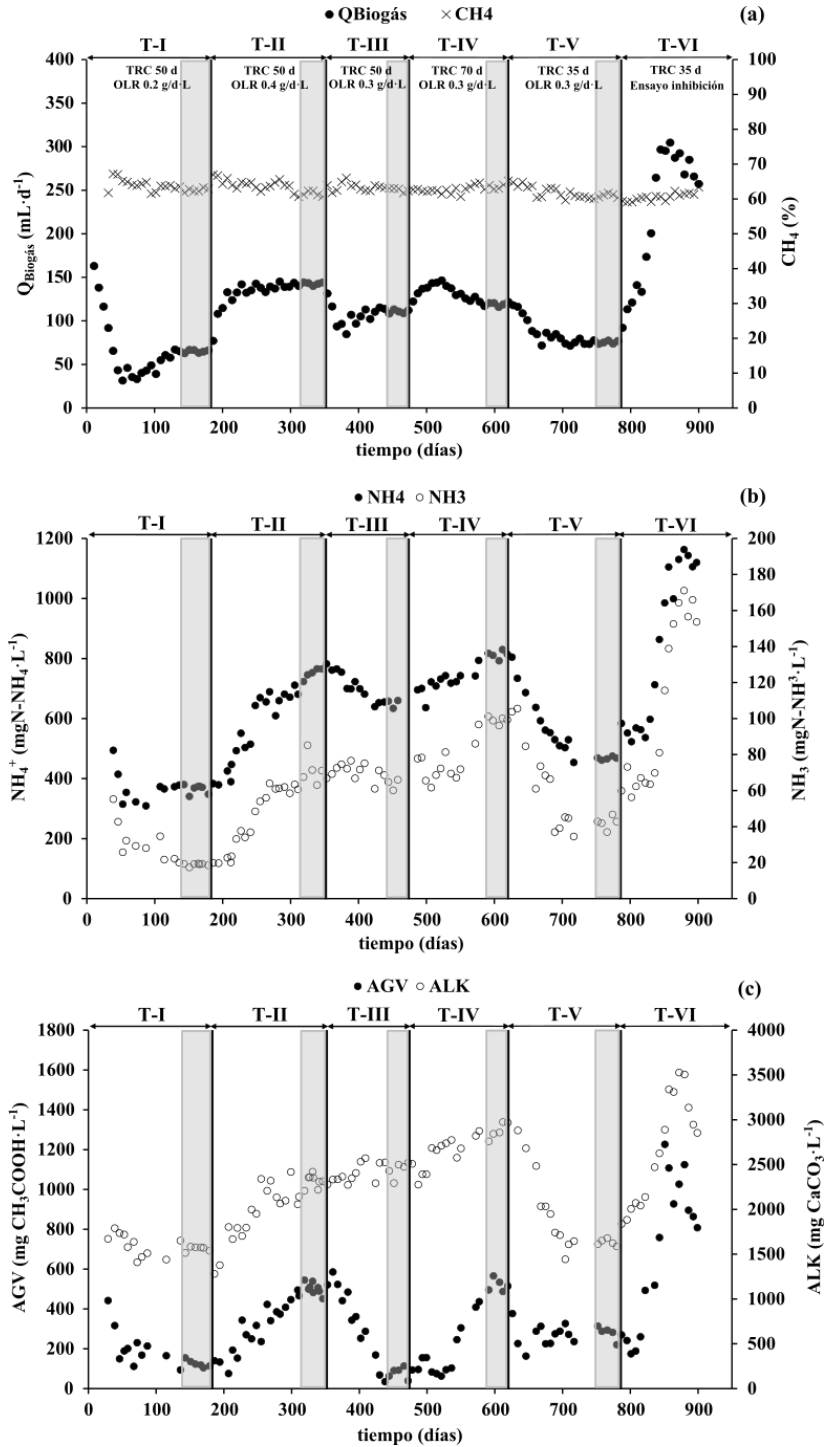


Figura 4.23. Evolución de la producción de biogás y el porcentaje de metano en el mismo (a), de la concentración de amonio y amoniaco (b) y de los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad (c) durante la operación del reactor termófilo.

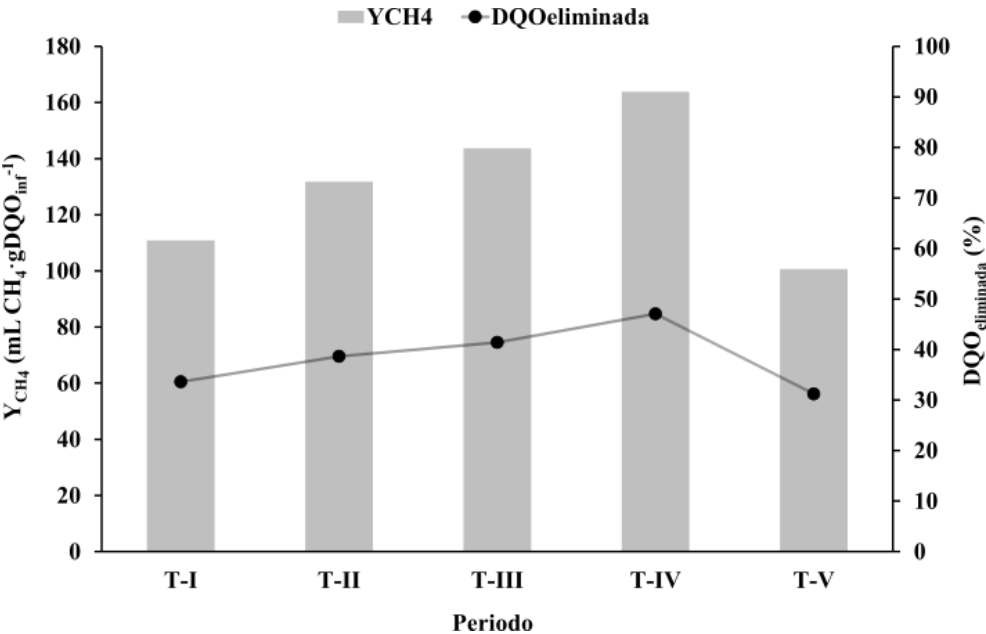


Figura 4.24. Rendimiento del reactor CSTR termófilo en los cinco periodos pseudo-estacionarios identificados, en términos de eliminación de DQO y metano producido por gramo de DQO alimentada.

En la Tabla 4.16 se resume los valores promedios de los parámetros característicos del proceso biológico, obtenidos en cada uno de los cinco periodos pseudo-estacionarios identificados, así como el rendimiento del proceso en términos de producción de metano por gramo de DQO influente, eliminación de DQO y biodegradabilidad. El porcentaje de eliminación de DQO y la biodegradabilidad se calcularon mediante la ecuación 3.13 y la ecuación 3.15 respectivamente, y la concentración de amoniaco fue calculada mediante la ecuación 3.18. En esta tabla puede observarse que la biodegradabilidad es aproximadamente un 2% inferior a la eliminación de DQO debido a que parte de esta DQO es eliminada por las SRB, pero

éstas no contribuyen a la producción de metano. La presencia de SRB en el reactor se debe a la concentración de sulfato que se alimentan con la biomasa algal (ver Tabla 4.12).

Tabla 4.16. Resumen de los parámetros que caracterizan el rendimiento de la digestión anaerobia termófila y de los más influyentes en el proceso, presentados como media \pm desviación estándar.

	T-I	T-II	T-III	T-IV	T-V
$Q_{\text{biogás}}$ ($\text{mL}\cdot\text{d}^{-1}$)	65.3 ± 1.2	142.9 ± 14.7	110.3 ± 2.1	121.4 ± 2.2	75.3 ± 1.7
CH_4 (%)	62.6 ± 1.9	61.9 ± 1.6	62.5 ± 0.9	63.8 ± 1.5	60.8 ± 1.5
Y_{CH_4} ($\text{mLCH}_4\cdot\text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$)	110.9 ± 3.2	131.8 ± 0.4	143.7 ± 3.9	163.8 ± 3.7	100.6 ± 3.2
$\text{DQO}_{\text{eliminada}}$ (%)	33.6 ± 1.2	38.9 ± 0.4	41.4 ± 3.5	47.1 ± 3.9	31.2 ± 2.3
Biodegradabilidad (%)	31.7 ± 1.1	37.7 ± 0.9	41.1 ± 1.1	46.8 ± 1.0	29.7 ± 0.9
NH_4^+ ($\text{mgN}\cdot\text{NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$)	365.34 ± 14.79	750.62 ± 17.55	652.08 ± 10.42	813.00 ± 13.52	467.80 ± 5.08
NH_3 ($\text{mgN}\cdot\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	19.69 ± 0.85	71.66 ± 8.77	62.23 ± 3.09	99.12 ± 1.88	42.26 ± 3.49
pH	7.14 ± 0.02	7.37 ± 0.05	7.40 ± 0.06	7.49 ± 0.08	7.38 ± 0.08
AGV ($\text{mgCH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$)	124.8 ± 17.8	497.1 ± 27.1	79.7 ± 28.6	519.7 ± 31.6	279.7 ± 35.3
ALK ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	1559.8 ± 27.3	2333.1 ± 62.3	2443.7 ± 90.3	2880.7 ± 90.7	1630.7 ± 36.1

4.3.3.1. Efecto de la temperatura de operación

La digestión anaerobia termófila de microalgas se inició bajo las mismas condiciones operacionales establecidas en el reactor CSTR mesófilo (Periodo M-I), un TRC de 50 días y una OLR de $0.2 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, como puede verse en la Tabla 3.4 (Periodo T-I, Pág. 104). Estas condiciones de operación fueron seleccionadas con el fin de comprobar si, bajo la configuración CSTR, se podía obtener una mayor biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. incrementando la temperatura de trabajo del reactor.

Como puede verse en la Figura 4.23, el reactor CSTR termófilo mostró un periodo inicial de adaptación de la biomasa a la degradación de microalgas de aproximadamente tres meses, en los que la producción de biogás fue descendiendo (Figura 4.23a) a medida que se consumían los ácidos presentes en el reactor (Figura 4.23c), procedentes del propio inóculo. Tras este tiempo de adaptación, el proceso alcanzó una producción de biogás de $65.3 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ y una producción de metano de $110.9 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ en el estado pseudo-estacionario (Figura 4.24, Tabla 4.16). Esta producción de metano fue 2.8 veces superior a la obtenida en el reactor CSTR mesófilo bajo las mismas condiciones operacionales (periodo M-I de la Tabla 4.9), resultando en una biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. del 31.7% (Tabla 4.16). El mayor rendimiento obtenido en el CSTR operado a 55°C denota la mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos, lo cual da lugar a una mayor concentración de amonio en el reactor ($365.34 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$) en comparación con el periodo M-I ($174.97 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, Tabla 4.11). Zamalloa et al. (2012a) detectaron una tendencia similar durante la digestión anaerobia de las microalgas *Scenedesmus obliquus*, obteniendo una producción de biogás 1.3 veces superior a 55°C que a 35°C y demostrando así, la mayor capacidad hidrolítica de la comunidad microbiana termófila.

Sin embargo, pese a que la concentración de amonio en periodo T-I fue 2.1 veces superior que en el periodo M-I, la concentración de amoniaco en el CSTR termófilo se mantuvo por debajo de las concentraciones inhibitorias reportadas hasta el momento (Figura 4.23b, Tabla 4.16). Aunque la bibliografía existente presenta una gran variabilidad de concentraciones de amoniaco que producen la inhibición del proceso, las cuales oscilan entre 40 y $900 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ en función de la temperatura, el pH, la relación C/N del alimento y la aclimatación previa de la biomasa anaerobia (Appels et al., 2008; Belmonte et al., 2011; Buendía et al., 2009; Liu and Sung, 2002; Yenigün and Demirel, 2013), la estabilidad de los AGV en el reactor y la elevada alcalinidad presente demuestra que la inhibición del proceso no tuvo lugar.

No obstante, una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, los AGV no fueron totalmente consumidos por los microorganismos acetotróficos y transformados a metano, permaneciendo una concentración residual de $124.8 \text{ mgCH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$ en el reactor (Figura 4.23c, Tabla 4.16). Esto se debe a que las concentraciones de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ y la elevada temperatura de operación afectan a la población de archaeas acetoclásticas, en concreto al género *Methanosaeta*, la cuales presentan una mayor sensibilidad a estas condiciones ambientales que las archaeas hidrogenotróficas (Chen et al., 2008; Demirel and Scherer, 2008). El detrimento de los metanógenos acetotróficos junto con la mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos da lugar a que se produzca esta ligera acumulación de ácidos en el reactor, y a que se potencie el crecimiento de las archaeas pertenecientes al género *Methanosarcina* (Demirel and Scherer, 2008; Zheng and Raskin, 2000). Este género está compuesto por archaeas acetoclásticas, capaces de crecer en presencia de una elevada concentración AGV pero con una velocidad de consumo de ácidos inferior al género *Methanosaeta*, y por archaeas hidrogenotróficas, potenciándose así la producción de metano por vía hidrogenotrófica (Angenent et al., 2002; Demirel and Scherer, 2008). Sin embargo, esta presencia de AGV no provocó un descenso significativo del pH en el reactor (Tabla 4.16), por lo que queda patente la ausencia de inhibición en el proceso.

4.3.3.2. Efecto de la velocidad de carga orgánica

Generalmente, el incremento de la velocidad de carga orgánica alimentada al reactor da lugar a mayores producciones de biogás e incrementa el rendimiento del proceso, siempre y cuando no se supere el óptimo (Appels et al., 2008; Kwietniewska and Tys, 2014). Sin embargo, la digestión anaerobia de sustratos con alto contenido en nitrógeno libera elevadas cantidades de amonio al medio que, combinadas con temperaturas de operación termófilas, puede generar la inhibición del proceso biológico por amoniaco (Caporgno et al., 2015b). Por ello, para conseguir una

eficiente conversión de la materia orgánica, la OLR y el TRH deben optimizarse en función del tipo de sustrato que se pretende degradar (Sialve et al., 2009).

Así pues, con el fin de incrementar la eficiencia del proceso, en el periodo T-II se procedió a incrementar la carga desde 0.2 hasta 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹, manteniendo el TRC en 50 días (Tabla 3.4, pág. 104). No obstante, a diferencia del estudio de carga realizado en el reactor mesófilo (Periodo M-III), el incremento de la OLR se realizó modificando únicamente la concentración de microalgas en el alimento, desde 9991 hasta 19935 mgO₂·L⁻¹ (Tabla 4.12, pág. 193). La limitada flexibilidad de operación de la configuración CSTR no permite modificar el caudal de tratamiento si se desea mantener el TRC (Ec. 4.6), como consecuencia de la ausencia de un sistema de separación físico que independice el TRH y el TRC.

Como resultado de duplicar la OLR alimentada, se produjo un rápido incremento inicial de la producción de biogás, tal y como se aprecia en la Figura 4.23a, alcanzando un caudal medio de 142.9 mL·d⁻¹ en el estado pseudo-estacionario. Este incremento del biogás producido se correspondió con una eliminación de DQO del 38.8%, dando lugar a un rendimiento de metano de 131.8 mLCH₄·gDQO⁻¹ y una biodegradabilidad del 37.7% (Figura 4.24, Tabla 4.16). Aunque estos resultados muestran una ligera mejora en la eficiencia del proceso, cabría esperar que la elevada actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos produjera un incremento en la biodegradación de las microalgas superior al 8.8% obtenido en condiciones mesófilas. Sin embargo, la mayor hidrólisis de la biomasa algal también da lugar a una mayor liberación de amonio al medio que, junto con la elevada temperatura y el aumento del pH, origina el desplazamiento del equilibrio NH₄⁺/NH₃ hacia la forma no ionizada, que tiene un efecto tóxico sobre la población metanogénica (Montingelli et al., 2015; Ras et al., 2011). La inestabilidad del proceso debido a la mayor presencia de amoniaco resulta en una acumulación de AGV, lo cual desciende el pH y, por tanto, la concentración de NH₃ en el reactor hasta alcanzar un equilibrio. Esta interacción de procesos da lugar a un estado pseudo-estacionario inhibido, donde el

proceso tiene lugar de forma estable pero con un reducido rendimiento de producción de metano. Este fenómeno ocurrido en el reactor CSTR termófilo puede observarse en la evolución de los distintos parámetros, mostrada en la Figura 4.23. A medida que las microalgas se hidrolizan, se incrementa la producción de AGV disponibles para los metanógenos (Figura 4.23c) pero también la concentración de amonio y amoníaco en el reactor (Figura 4.23b). Puesto que la actividad metanogénica decrece en presencia de NH_3 , los AGV producidos por la elevada capacidad hidrolítica de la biomasa termófila no son transformados a metano, acumulándose en el reactor y limitándose la producción de biogás (Figura 4.23a). Un efecto similar fue descrito por Chen et al. (2008) como uno de los principales problemas de la digestión anaerobia, y por Kwietniewska and Tys (2014) como uno de los mayores inconvenientes asociados a la digestión anaerobia de microalgas debido a su baja relación C/N.

Una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, la concentración de amonio en el reactor se mantuvo en un valor medio de $750.62 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, y la de amoníaco en $71.66 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para un pH de 7.37 (Tabla 4.16). En comparación con el estudio de carga realizado en el reactor mesófilo, en el que se incrementó la OLR en la misma proporción (Periodo M-III), la concentración de NH_4^+ obtenida en condiciones mesófilas fue de 3.5 veces inferior a la obtenida en el CSTR termófilo, incluso alcanzando una mayor biodegradabilidad (Tabla 4.9), lo que demuestra la elevada importancia de la concentración de microalgas en el alimento y de la configuración del reactor a la hora de degradar sustratos con bajas relaciones C/N. La ausencia de un sistema físico de separación en el reactor CSTR termófilo, obliga a que el incremento de carga se realice duplicando la concentración de microalgas en el alimento, puesto que no permite modificar el caudal alimentando sin alterar el TRC. Esta forma de operar el reactor implica la alimentación de elevadas concentraciones de nitrógeno al mismo, lo cual potencia la inestabilidad del proceso (Zamalloa et al., 2012a). Por el contrario, la selección de una configuración de reactor que permite

independizar el TRC y el TRH, y así alimentar el reactor con una corriente de microalgas más diluida, podría ayudar a reducir o incluso prevenir la inhibición del proceso por amoníaco (Montingelli et al., 2015). Así mismo, se reducirían los costes asociados al proceso de concentración de microalgas y las necesidades de superficie, debido a que se podrían operar reactores de menor volumen.

Por consiguiente, con el fin de corroborar el efecto de la velocidad de carga orgánica, en el periodo T-III se procedió a reducir la OLR desde 0.4 a 0.3 gDQO·d⁻¹·L⁻¹, manteniendo el TRC en 50 días (Tabla 3.4, Pág. 104). Esta reducción de la OLR se realizó disminuyendo la concentración de microalgas alimentada desde 19935 hasta 14938 mgDQO·L⁻¹ (Tabla 4.12). Como puede verse en la Figura 4.23b, la dilución del alimento provocó un progresivo descenso de la concentración de amonio y de amoníaco en el reactor, como consecuencia de que la hidrólisis de microalgas menos concentradas da lugar a menores concentraciones de amonio en el medio, reduciendo consecuentemente la concentración de amoníaco en el reactor. Por ello, una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, los valores de amonio y amoníaco se redujeron hasta 652.08 mgN-NH₄·L⁻¹ y 62.23 mgN-NH₃·L⁻¹, respectivamente, para un pH de 7.40 (Tabla 4.16). Paralelamente al descenso del nitrógeno amoniacal en el reactor, también se apreció un acusado descenso de la concentración de AGV (Figura 4.23c). Esta disminución de los ácidos en el reactor no sólo se debe a su menor producción debida a la menor concentración de microalgas alimentadas, como en el caso de la reducción del amonio liberado, sino también a la reducción de la inhibición de la actividad metanogénica debido al descenso de amoníaco en el reactor, puesto que el consumo de los AGV por parte de los metanógenos consiguió reducir su concentración hasta 79.7 mg·L⁻¹ (Tabla 4.16). Esta baja concentración de AGV fue incluso inferior a la obtenida en el periodo T-I (Tabla 4.16), en el que la concentración de NH₃ no superó los 20 mg N-NH₃·L⁻¹, lo que además demuestra la capacidad para aclimatare gradualmente a la presencia de amoníaco que muestran los metanógenos acetoclásticos, normalmente pertenecientes a la familia

Methanosarcinaceae (Fotidis et al., 2013). Aunque la alimentación a una menor carga de materia orgánica supuso un descenso en la producción de biogás (Figura 4.23a), dicho incremento en el consumo de AGV por parte de la población metanogénica resultó en un mayor rendimiento de producción de metano, la cual se incrementó de 131.8 a 143.7 mLCH₄·gDQO_{inf}⁻¹ en comparación con el periodo T-II, y 1.3 veces con respecto al periodo T-I (Figura 4.24, Tabla 4.16), dando lugar a una biodegradabilidad del 41.1% (Tabla 4.16).

Este resultado corrobora que en el periodo T-II se estableció un estado pseudo-estacionario inhibido en el que la biometanización de la biomasa algal se vio limitada por la presencia de amoníaco. Así mismo, se confirma la importancia de optimizar tanto la OLR como la concentración de microalgas alimentadas, dado el efecto positivo sobre la eficiencia del proceso que se consigue con la dilución del alimento y el incremento de la OLR de 0.2 a 0.3 gDQO·d⁻¹·L⁻¹.

4.3.3.3. Efecto del tiempo de residencia

El tiempo de residencia de la biomasa anaerobia en el reactor es uno de los factores que mayor influencia tienen sobre la eficiencia del proceso, tal y como se ha demostrado en el estudio de digestión anaerobia en condiciones mesófilas realizado en la presente tesis. Elevados TRC permiten que la población microbiana activa permanezca en el reactor y se potencie la hidrólisis del sustrato, especialmente en la digestión de sustratos orgánicos complejos como las microalgas, en la que la hidrólisis suele ser la etapa limitante del proceso. Por ello, en el periodo T-IV se procedió a incrementar el TRC desde 50 a 70 días, manteniendo la OLR en 0.3 gDQO·d⁻¹·L⁻¹, con el fin de evaluar si este parámetro tiene un efecto positivo sobre la eficiencia del proceso, puesto que un incremento en la biodegradación de materia orgánica también da lugar a una mayor liberación de NH₄ al medio y podría afectar a la estabilidad del proceso. Para aumentar el TRC sin modificar la velocidad de carga orgánica alimentada al reactor, la concentración de microalgas en la corriente

de alimento tuvo que incrementarse de 14938 a 19948 mgDQO·L⁻¹ (Tabla 4.12), debido a la que la configuración CSTR no permite desacoplar el TRC y el TRH.

La Figura 4.23a muestra que el aumento del TRC en el reactor produjo un progresivo incremento de la producción de biogás como consecuencia de la mayor hidrólisis de la biomasa algal, hasta alcanzar un máximo el día 522 de operación. Esta mayor hidrólisis dio lugar a un continuo incremento de las concentraciones de amonio y amoníaco (Figura 4.23b), mientras que los AGV se mantuvieron constantes durante este periodo inicial de incremento de la producción de biogás (Figura 4.23c). La ausencia de la acumulación de AGV en estos primeros 48 días de operación denota la presencia de una activa población metanógena, establecida gracias al elevado tiempo de residencia, capaz de consumir los AGV generados durante el proceso debido a que las concentraciones de NH₃ alcanzadas no provocaron su inhibición. Sin embargo, a partir del día 522 de operación, se produjo una rápida acumulación de AGV (Figura 4.23c) y un descenso de la producción de biogás (Figura 4.23a), lo que indica que los metanógenos acetoclásticos empezaron a inhibirse. Esta inhibición se detectó a partir de una concentración de NH₃ de 70 mgN-NH₃·L⁻¹ (Figura 4.23b).

Una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario en el periodo T-IV, la concentración de amonio se mantuvo en 813.00 mgN-NH₄·L⁻¹ y la de amoníaco en 99.12 mgN-NH₃·L⁻¹, con un pH de 7.49. Estas elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal dieron lugar a una acumulación de AGV de 519.7 mg·L⁻¹, por lo que la biodegradabilidad solo se incrementó en un 6.1% en comparación con el periodo T-III, produciendo un caudal medio de biogás de 121.4 mL·d⁻¹ con un 63.8% de metano (Tabla 4.16). Esta producción se corresponde con un rendimiento de metano de 163.8 mLCH₄·gDQO_{inf}⁻¹ y una eliminación de DQO de 47.1% (Figura 4.24, Tabla 4.16). Dado que en condiciones mesófilas se apreció un notable incremento en la biodegradabilidad de la biomasa algal con los sucesivos aumentos del TRC, incluso tratando una mayor OLR que el reactor termófilo, se esperaba que

la mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos diera lugar a un rendimiento del proceso superior. Sin embargo, el efecto combinado del incremento de la concentración de microalgas en el alimento con una mayor hidrólisis de la biomasa algal debido al aumento del TRC, dio lugar a que nuevamente se estableciera un estado pseudo-estacionario inhibido, tal y como sucedió en el periodo T-II (Figura 4.23).

Estos resultados demuestran que la configuración CSTR no es la más adecuada para tratar sustratos con una baja relación C/N y resistentes a la degradación anaerobia, tales como las microalgas. Al no independizarse el TRC del TRH y tener que operar el reactor a altos TRC para incrementar la biodegradabilidad, no permite trabajar con una corriente diluida de microalgas si se desea mantener la OLR, afectando así a la estabilidad y el rendimiento del proceso.

Con el propósito de reducir o incluso eliminar por completo la inhibición del proceso por amoníaco, en el periodo T-V se disminuyó el TRC desde 70 a 35 días, manteniendo la OLR en $0.3 \text{ gDQO} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabla 3.4, Pág. 104). El descenso del TRC se realizó incrementando el caudal purgado y alimentado del reactor, por lo que la concentración de microalgas en el alimento se redujo desde 19948 a 9958 $\text{mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ para poder mantener la OLR.

Tras este cambio operacional, la Figura 4.23b muestra el descenso paulatino de la concentración de amonio y amoníaco en el reactor debido tanto a la alimentación de una corriente de microalgas más diluida como a la purga de una mayor cantidad de biomasa anaerobia, lo que implica que la población de microorganismos activos en el reactor se ve reducida, disminuyendo así la hidrólisis de la biomasa algal. Consecuentemente, la menor hidrólisis de las microalgas y el descenso del amoníaco dieron lugar a la progresiva disminución de la concentración de AGV en el reactor (Figura 4.23c).

Una vez alcanzado el estado pseudo-estacionario, la concentración de amonio se estableció en $467.80 \text{ mgN-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ y la de amoníaco en $42.26 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ con un pH de 7.38, produciéndose un descenso de los AGV hasta $279.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La producción de biogás se redujo hasta $75.3 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ con una composición de metano media de 60.8% (Tabla 4.16), correspondiente a un rendimiento de metano de $100.6 \text{ mLCH}_4\cdot\text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$ y una biodegradabilidad de 29.7% (Figura 4.24, Tabla 4.16).

En comparación con el periodo T-IV, en el que se operó el reactor a 70 días de TRC y la misma OLR, la reducción del TRC a la mitad solo produjo un descenso en la biodegradabilidad del 17.1% mientras que la concentración de NH_3 en el periodo T-V fue 2.35 veces inferior, lo que denota la parcial inhibición que existía en el periodo T-IV. Por el contrario, comparando los resultados obtenidos con el periodo T-III, donde el reactor se operó con la misma OLR y un TRC de 50 días, la concentración de NH_3 descendió 1.47 veces siendo prácticamente proporcional al descenso del TRC, lo que produjo una disminución de la biodegradabilidad del 11.4% (1.38 veces) en el periodo T-V. Así mismo, la menor acumulación de AGV que tuvo lugar en el periodo T-V en comparación con el T-IV y la presencia de NH_3 en concentraciones inferiores a los $70 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ permite concluir que este periodo alcanzó el estado pseudo-estacionario en ausencia de inhibición.

Estos resultados muestran que la optimización de la digestión anaerobia de microalgas para maximizar la producción de biogás no solo depende de la OLR alimentada y el TRC del reactor, sino que la concentración de microalgas en el alimento también es un factor importante en el rendimiento y estabilidad del reactor. En base a los resultados obtenidos en la digestión anaerobia de microalgas en condiciones mesófilas, el uso de membranas anaerobias sería una alternativa tecnológica a la configuración CSTR convencional, que permitiría tratar elevados caudales de microalgas sin incrementar su concentración en el influente ni el volumen del reactor, lo que además reduce los costes de concentración de las microalgas y la superficie de trabajo.

Tras comprobar la ausencia de inhibición del proceso biológico, se tomaron cinco muestras durante el estado pseudo-estacionario de este periodo (T-V) para llevar a cabo su análisis microbiológico con el propósito de estudiar el potencial hidrolítico de los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia de microalgas bajo condiciones termófilas. Este análisis a nivel genómico se muestra posteriormente en el apartado 4.4 (pág. 233).

4.3.4. Sólidos en el reactor y producción de fangos

El rendimiento del proceso en cada periodo así como el efecto de los cambios operacionales se ven claramente reflejados en la evolución de los sólidos en el reactor. Los procesos de digestión anaerobia con una baja eficiencia, bien sea por la presencia de inhibidores o por una operación inadecuada, dan lugar a la acumulación de sólidos en el reactor, lo que incrementa la producción de fangos y, consecuentemente, los costes del proceso asociados a su tratamiento y disposición.

En la Figura 4.25a se muestra la concentración de los sólidos totales, los sólidos volátiles y el porcentaje de sólidos volátiles en el reactor termófilo durante toda la experimentación, mientras que en la Figura 4.25b se muestra la producción de fangos y los sólidos volátiles eliminados en cada periodo de estudio en el que se alcanzó el estado pseudo-estacionario. Así mismo, en la Tabla 4.17 se presentan los valores medios de sólidos totales y volátiles en el reactor, la producción de fangos y la eliminación de sólidos en el estado pseudo-estacionario de cada periodo experimental, calculándose el porcentaje de sólidos volátiles eliminados mediante la ecuación 3.14.

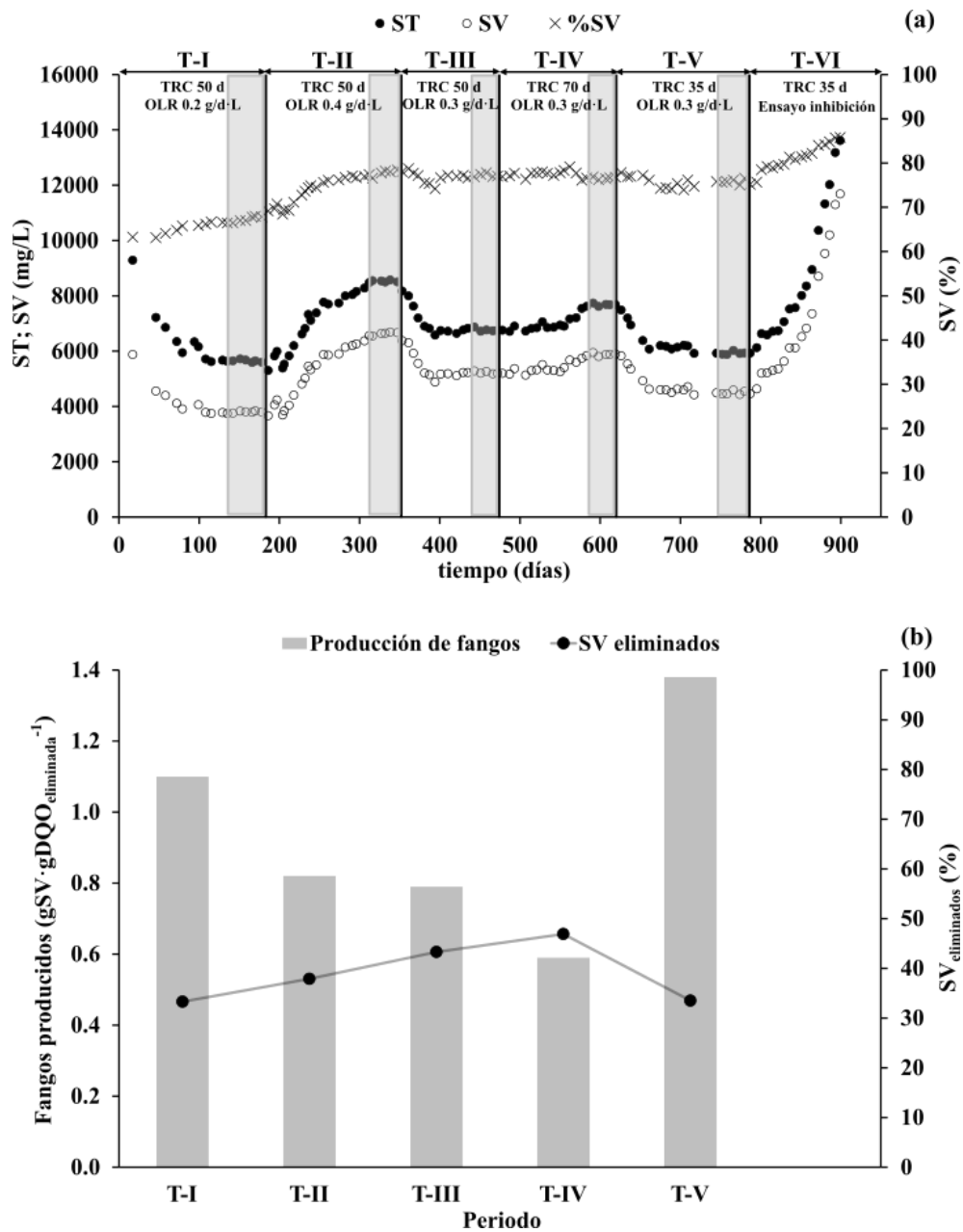


Figura 4.25. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles (a), y eliminación de SV y producción de fango (b) durante la operación del reactor termófilo.

Como puede observarse en la Figura 4.25a, tras un periodo de puesta en marcha de 100 días, los sólidos totales alcanzaron un valor de $5648 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el estado pseudo-estacionario del periodo T-I. Este valor es inferior a los $6480 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obtenidos en el periodo M-I del reactor mesófilo, el cual fue operado bajo las mismas condiciones operacionales y configuración de reactor (Tabla 4.10, Pág. 178), lo que corrobora la mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos que originó que la biodegradabilidad fuera un 20.4% superior en el periodo T-I que en el M-I. Esta mayor biodegradabilidad de la biomasa algal en el CSTR termófilo como consecuencia de un mayor porcentaje de sólidos hidrolizados, dio lugar a una producción de fangos de $1.10 \text{ gSV}\cdot\text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ (Figura 4.25b, Tabla 4.17), sustancialmente menor que la producción de $4.28 \text{ gSV}\cdot\text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ obtenida en el periodo M-I del reactor mesófilo (Tabla 4.10, Pág. 178).

Tabla 4.17. Sólidos totales y volátiles, producción de fango y eliminación de SV en cada periodo pseudo-estacionario alcanzado en el reactor termófilo, expresados como media \pm desviación estándar.

	TRC (d)	OLR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	ST _{reactor} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	SV _{reactor} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fango producido ($\text{gSV}\cdot\text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$)	SV _{eliminados} (%)
T-I	50	0.2	5648 ± 54	3812 ± 23	1.10 ± 0.03	33.3 ± 1.3
T-II	50	0.4	8534 ± 70	6638 ± 55	0.82 ± 0.02	37.9 ± 2.1
T-III	50	0.3	6767 ± 61	5106 ± 76	0.79 ± 0.02	43.4 ± 1.7
T-IV	70	0.3	7750 ± 63	5783 ± 63	0.59 ± 0.04	46.9 ± 1.1
T-V	35	0.3	5949 ± 47	4523 ± 35	1.38 ± 0.04	33.5 ± 3.1

En el periodo T-II, el incremento de la OLR de 0.2 a $0.4 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ supuso un progresivo incremento de los sólidos (Figura 4.25a), alcanzándose una concentración de ST de $8534 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y de SV de $6638 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el estado pseudo-estacionario. A pesar de este incremento de los sólidos, la producción de fangos se

redujo hasta $0.82 \text{ gSV} \cdot \text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ debido a la mayor biodegradabilidad alcanzada como resultado de un aumento en el porcentaje de sólidos eliminados hasta el 37.9% (Figura 4.25b, Tabla 4.17). Sin embargo, el estado pseudo-estacionario inhibido que se alcanzó en este periodo, tal y como se describió anteriormente (apartado 4.3.3.2, Pág.205), provocó que el descenso de la producción de fangos fuera sólo del 25.5%, inferior a la disminución del 34.7% resultante del estudio de carga de realizado en el periodo M-III del reactor mesófilo (Tabla 4.10, Pág. 178). Dado que cabría esperar una mayor reducción en la producción de fangos debido a la mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos, este resultado corrobora la parcial inhibición del proceso en el periodo T-II.

Así mismo, esta parcial inhibición puede confirmarse con los resultados obtenidos en el periodo T-III, en el cual se redujo la OLR de 0.4 a $0.3 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ manteniendo el TRC en 50 días. Tras disminuir la carga, los sólidos totales y volátiles descendieron rápidamente hasta alcanzar una concentración de $6767 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $5106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, resultando en una producción de fangos de $0.79 \text{ gSV} \cdot \text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$, ligeramente inferior a la obtenida en el periodo T-II. El descenso de la OLR alimentada al reactor también produjo un descenso en la concentración de amoníaco en el reactor (Figura 4.23b), lo que finalmente dio lugar a un incremento del porcentaje de sólidos eliminados hasta 43.4% y corrobora tanto la parcial inhibición que existía en el periodo T-II como el efecto positivo de alimentar microalgas más diluidas.

Por su parte, en el periodo T-IV en el que se incrementó el TRC de 50 a 70 días manteniendo la OLR, no se apreció un cambio significativo de los sólidos en el reactor durante la primera mitad del periodo, lo que denota que un mayor TRC potencia la hidrólisis de la biomasa algal por parte de los microorganismos así como la ausencia de inhibición en estos primeros 48 días del periodo (Figura 4.25a). Sin embargo, a partir del día 530 de operación los sólidos empezaron a incrementarse hasta alcanzar una concentración en ST de $7750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, en el estado pseudo-

estacionario (Figura 4.25a, Tabla 4.17). Este incremento se produjo en el momento en el que la concentración de amoníaco superó los $70 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, coincidiendo con la acumulación de AGV en el reactor y el descenso de la producción de biogás explicado anteriormente en el apartado 4.3.3.3 (pág. 209). Esta acumulación de sólidos confirma la parcial inhibición del proceso en el estado pseudo-estacionario, debido al efecto conjunto de incrementar la hidrólisis en el reactor y la concentración de microalgas en el alimento para poder mantener la OLR en $0.3 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, lo que provocó un reducido rendimiento del proceso y, por tanto, que el porcentaje de sólidos eliminados solo se incrementara ligeramente hasta 46.9% y la producción de fango sólo alcanzara los $0.59 \text{ gSV} \cdot \text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ (Figura 4.25b, Tabla 4.17). Aunque dicha producción de fango fue la menor obtenida en toda la experimentación, ésta fue superior a los $0.49 \text{ gSV} \cdot \text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$ resultante del periodo M-III en el que se operó el reactor AnMBR mesófilo a 70 días de TRC y una OLR de $0.4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabla 4.10). La menor producción de fango en el periodo M-III se debió a la mayor hidrólisis de sólidos alcanzada y a la ausencia de inhibición, pese a que los microorganismos mesófilos presentan un menor actividad hidrolítica y a que se alimentó una mayor OLR. Esto se debe a la elevada concentración de microalgas en el alimento del CSTR termófilo en este periodo, lo cual lo hizo proclive a la inestabilidad.

Por último, en el periodo T-V en el que se disminuyó el TRC de 70 a 35 días manteniendo la OLR para eliminar la inhibición, los sólidos totales descendieron hasta $5949 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y los volátiles hasta $4523 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.25a, Tabla 4.17). Tal y como se detalló en el apartado 4.3.3.3, el menor TRC y la mayor dilución de las microalgas alimentadas disminuyeron la concentración de NH_4/NH_3 y de AGV en el reactor, eliminando la inhibición por amoníaco. Sin embargo, el descenso del TRC también reduce la hidrólisis de la biomasa algal, disminuyendo el porcentaje de sólidos eliminados hasta 33.5% e incrementando el fango producido hasta $1.38 \text{ gSV} \cdot \text{gDQO}_{\text{eliminada}}^{-1}$.

Estos resultados destacan la necesidad de encontrar un equilibrio entre la OLR, el TRC y la concentración de microalgas en el alimento para maximizar la eficiencia del proceso y evitar la inhibición del mismo, lo cual podría facilitarse mediante la configuración AnMBR con la que se conseguiría aumentar la hidrólisis del sustrato operando el reactor a elevado TRC, alimentando microalgas menos concentradas para que se redujera la presencia de amoníaco en el reactor, dado que la OLR se podría incrementar modificando únicamente el caudal alimentado. A su vez, el uso de microalgas más diluidas reduciría los costes de concentración de esta biomasa así como las necesidades de superficie en su escalado a planta industrial, puesto que se reduciría el volumen de reacción necesario para un caudal de tratamiento dado.

4.3.5. Calidad del efluente

Como se ha demostrado a lo largo del estudio de digestión anaerobia de microalgas, el elevado contenido de nitrógeno y fósforo de la biomasa algal, combinado con la alta concentración de microalgas en el alimento y la elevada actividad hidrolítica de los microorganismos involucrados en la digestión termófila, da lugar a la liberación de elevadas concentraciones de nutrientes al medio. En la Figura 4.26, en la que se muestra la evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato en el reactor termófilo, puede observarse que no solo el amonio sino también el fosfato varía en función de la biodegradabilidad alcanzada, según las condiciones operacionales establecidas en cada periodo, siendo ambos superiores a las concentraciones introducidas con el alimento (Tabla 4.12, pág. 193).

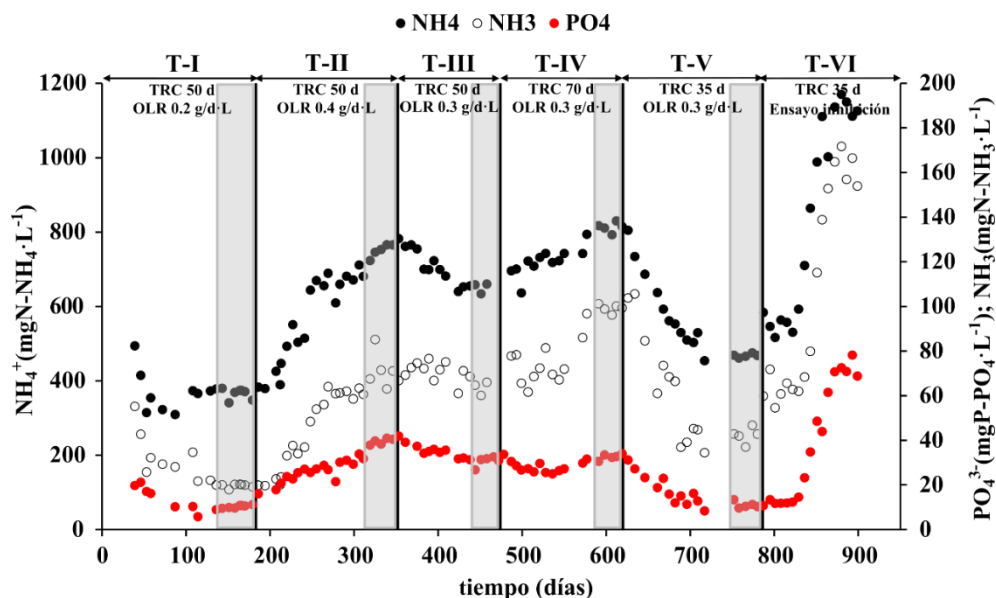


Figura 4.26. Evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato durante la operación del reactor termófilo.

Así mismo, en la Tabla 4.18 en la que se muestra la caracterización del efluente del CSTR termófilo en cada periodo pseudo-estacionario estudiado, puede apreciarse el elevado porcentaje de nitrógeno solubilizado, cuyo cálculo se realizó mediante la ecuación 4.3 (Pág. 182).

De la misma forma que en el reactor mesófilo, dichos porcentajes de nitrógeno solubilizado exceden los porcentajes de biodegradabilidad alcanzados (Tabla 4.16, Pág. 203), como consecuencia de la baja relación C/N de las microalgas empleadas como sustrato (Adegbidi and Briggs, 2003). Sin embargo, ambos porcentajes mantienen una relación puesto que cuanto mayor es la hidrólisis de la biomasa algal, mayor es la solubilización de nitrógeno en el reactor. Así pues, siguiendo la tendencia de la biodegradabilidad (Tabla 4.11, pág. 183), el nitrógeno solubilizado se incrementó progresivamente desde el periodo T-I hasta el periodo T-IV, en el cual alcanzó un máximo de 75.8% (Tabla 4.18), correspondiente con la máxima biodegradabilidad obtenida en toda la experimentación. Así mismo, en el periodo T-

V en el que se redujo la biodegradabilidad hasta un valor similar al obtenido en el periodo T-I, debido a la disminución del TRC de 70 a 35 días, el nitrógeno solubilizado también disminuyó hasta un valor cercano al obtenido en el periodo T-I (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Caracterización del efluente del reactor termófilo en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresada como media \pm desviación estándar.

	T-I	T-II	T-III	T-IV	T-V
DQO _T (mgO ₂ ·L ⁻¹)	6857 \pm 61	12316 \pm 129	8986 \pm 159	10686 \pm 155	7539 \pm 57
DQOs (mgO ₂ ·L ⁻¹)	623.3 \pm 75.3	1764.1 \pm 123	822.6 \pm 41.5	1484.7 \pm 130.3	1571.5 \pm 103.9
N _T (mgN·L ⁻¹)	571.0 \pm 29.7	1110.0 \pm 17.3	873.5 \pm 2.8	1070.0 \pm 159.1	708.3 \pm 42.2
P _T (mgP·L ⁻¹)	83.44 \pm 0.97	157.21 \pm 11.21	139.96 \pm 22.34	83.84 \pm 3.50	43.51 \pm 5.71
NH ₄ ⁺ (mgN-NH ₄ ·L ⁻¹)	365.34 \pm 14.79	750.62 \pm 17.55	652.08 \pm 10.42	813.00 \pm 13.52	467.80 \pm 5.08
NH ₃ (mgN-NH ₃ ·L ⁻¹)	19.69 \pm 0.85	71.66 \pm 8.77	62.23 \pm 3.09	99.12 \pm 1.88	42.26 \pm 3.49
PO ₄ ³⁻ (mgP-PO ₄ ·L ⁻¹)	10.65 \pm 1.25	37.37 \pm 3.49	29.47 \pm 5.38	31.32 \pm 3.61	10.98 \pm 1.31
SO ₄ ²⁻ (mgSO ₄ ·L ⁻¹)	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽¹⁾
pH	7.14 \pm 0.02	7.37 \pm 0.05	7.40 \pm 0.06	7.49 \pm 0.08	7.38 \pm 0.08
N _{solubilizado} (%)	64.7 \pm 4.6	68.6 \pm 2.1	73.9 \pm 2.7	75.8 \pm 3.2	62.9 \pm 2.8
P _{solubilizado} (%)	3.9 \pm 0.6	14.1 \pm 1.3	16.5 \pm 1.2	15.8 \pm 1.8	1.7 \pm 0.3

⁽¹⁾ Valores inferiores al límite de detección.

No obstante, en comparación con el reactor AnMBR mesófilo, a pesar de que el rendimiento del CSTR termófilo fue menor, los porcentajes de solubilización fueron mayores en ciertos periodos. En el periodo M-III, operado a un TRC de 70 días y una OLR de 0.4 g·d⁻¹·L⁻¹, la biodegradabilidad fue del 50.1% y la solubilización de nitrógeno del 68.1% mientras que en el T-IV, en el que se estableció también un TRC de 70 días y una OLR de 0.3 g·d⁻¹·L⁻¹, la biodegradabilidad fue del 46.8% y el nitrógeno solubilizado del 75.5%, incluso alimentando una menor carga. Esto corrobora que la concentración inicial de microalgas tiene un papel importante en el

rendimiento global del proceso, puesto que mayores concentraciones de microalgas dan lugar a mayores solubilizaciones de nutrientes, susceptibles de ser recuperados como subproductos en forma de fertilizantes. Sin embargo, también afectan al proceso biológico haciéndolo proclive a la inestabilidad debido a la presencia de amoníaco. Por ello, se debe encontrar un equilibrio en la operación del reactor que permita maximizar el biogás producido y la recuperación de nutrientes. Esta estrategia debe centrarse en alcanzar una elevada biodegradabilidad de las microalgas mediante el incremento del TRC y no de la concentración de microalgas en el alimento, lo que dará lugar a elevadas producciones de biogás y elevadas solubilizaciones de nutrientes. Tal y como se ha comentado con anterioridad, esto podría conseguirse implementando un sistema de separación físico que aportara a la operación del reactor una mayor flexibilidad.

En cuanto al fosfato, su concentración en el reactor evolucionó con una tendencia similar a la del amonio, variando en función de las condiciones operacionales establecidas (Figura 4.26). Sin embargo, tanto las concentraciones de fosfato alcanzadas como el correspondiente porcentaje de fósforo solubilizado fueron inferiores a las de amonio y a la solubilización de nitrógeno respectivamente. Esto se debe tanto a la menor proporción de fósforo que componen las microalgas con respecto a la de nitrógeno, como a la precipitación de fósforo dentro del reactor ya que en el periodo T-V el porcentaje de solubilización no supera el 2%, lo que denota su acumulación en el reactor. Por ello, un factor importante en la operación de los digestores de microalgas es evitar la precipitación incontrolada dentro del digestor, para propiciar su recuperación en el efluente, lo cual previene problemas operacionales de obstrucciones y permite incrementar la eficiencia de recuperación de nutrientes como subproducto, mejorando así el balance económico del proceso. Puesto que las concentraciones de calcio y fósforo son un factor de elevada influencia en la formación del precipitado (Mañas et al., 2012), la reducción de calcio en el influente o alimentar microalgas más diluidas para reducir la liberación de

fosfato durante la digestión, serían dos posibles opciones para evitar la precipitación incontrolada de fósforo en el reactor.

De la misma forma que en el reactor mesófilo, el alto contenido en nitrógeno y fósforo del fango (Tabla 4.18) lo convierte en una corriente potencialmente reutilizable como biofertilizante agrícola tras su deshidratación. Sin embargo, la ausencia de un sistema físico de separación de la biomasa anaerobia del efluente tratado como pueden ser las membranas anaerobias, no solo influye en la estabilidad del reactor debido a la mayor flexibilidad operacional que supondría su uso, sino también en la calidad del efluente. La configuración CSTR no permite obtener directamente una corriente de agua tratada, libre de sólidos y patógenos, sino únicamente la corriente de purga de fango. La presencia de elevadas concentraciones de sólidos en esta corriente y, consecuentemente, de microorganismos, junto con las elevadas concentraciones de DQO soluble como consecuencia de la acumulación de AGV en el reactor debido a la presencia de amoníaco, dificulta su posible reutilización como fertilizante o para la generación de subproductos, debido a que el elevado porcentaje de impurezas que presenta dificulta su proceso de obtención.

4.3.6. Estudio de inhibición

Los resultados obtenidos hasta el momento, de la experimentación realizada en el reactor CSTR termófilo, han mostrado que el aumento de la concentración de microalgas en el alimento junto con el incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal, da lugar a la liberación de grandes cantidades de amonio al medio. Este incremento de amonio combinado con la elevada temperatura de operación provoca el aumento de la concentración de amoníaco en el reactor, el cual alcanzó concentraciones que generaron signos de inhibición parcial del proceso en dos de los periodos estudiados, T-II y T-IV. Sin embargo, distintos autores han reportado en sus publicaciones la capacidad de aclimatación que tiene la biomasa anaerobia al paulatino incremento de este inhibidor en el reactor (Sung and Liu, 2003; Yenigün

and Demirel, 2013). Por consiguiente, conocer la concentración de amoníaco que empieza a generar la inhibición del proceso en cada caso particular, es una valiosa información para desarrollar la estrategia de operación más adecuada.

Para ello, se llevó a cabo un estudio de inhibición en el propio reactor termófilo, a lo largo de lo que se ha denominado periodo T-VI, en el que se mantuvo el TRC en 35 días para asegurar que el proceso partiera de una situación de ausencia de inhibición. En este estudio, se incrementó la OLR de forma escalonada (0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 1.0 $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) mediante el incremento de la concentración de microalgas en la corriente influente, tal y como se muestra en la Tabla 4.13 (Pág. 194), con el fin de evaluar la influencia de la concentración de microalgas y conocer la concentración de amonio para la que se empieza a inhibir el proceso. Las distintas OLR fueron alimentadas durante un tiempo mínimo de 18 días (Tabla 4.13, Pág. 194).

En la Figura 4.23b (Pág. 202) se observa que en el periodo inicial de 40 días, en el que se alimentó una carga de $0.4 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ durante los 22 primeros días y una carga de $0.6 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ durante los días siguientes, el amonio solo exhibió un ligero incremento desde $467.80 \text{ mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ en el periodo T-V hasta un valor medio de $549.16 \text{ mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ debido al bajo potencial hidrolítico que tiene el proceso anaerobio a un TRC de 35 días. A su vez, la concentración de amoníaco fue ascendiendo paulatinamente mientras que los AGV se mantuvieron estables en $226.86 \text{ mgAGV}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo su concentración incluso inferior a la obtenida en el periodo T-V (Figura 4.23c, Pág. 202). Sin embargo, a partir del día 40 de estudio (día 823 de experimentación) la concentración de AGV se incrementó bruscamente hasta casi el doble, coincidiendo con una concentración de amoníaco de $68.39 \text{ mg N-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ y con el inicio de la acumulación de sólidos en el reactor (Figura 4.25a, Pág. 214). Esta acumulación repentina de AGV en el reactor, así como el inicio del incremento de los sólidos, denotan que el proceso biológico es sensible a esta concentración de amoníaco y empieza a inhibirse. No obstante, la producción de

biogás fue aumentando, lo que indica que la población metanogénica solo estaba parcialmente inhibida (Figura 4.23a, Pág. 202).

A medida que se incrementó la OLR alimentada, se produjo un drástico aumento de las concentraciones de amonio y amoníaco que dio lugar a una elevada acumulación de AGV y sólidos en el reactor. Paralelamente, la producción de biogás también fue incrementándose debido probablemente a que los reactores termófilo producen un alto porcentaje del metano por vía hidrogenotrófica, siendo éstos metanógenos más resistentes a elevadas concentraciones de amoníaco. Sin embargo, una vez la concentración de amoníaco superó los $150 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.23b, Pág. 202), la población metanogénica se vio fuertemente inhibida y la producción de CH_4 empezó a descender (Figura 4.23a, Pág. 202).

Comparando con el resto de periodos experimentales estudiados, en los periodos T-II y T-IV en los que se detectó una inhibición parcial del proceso, esta inhibición también se produjo cuando la concentración de amoníaco superó los $70 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, aunque el proceso se recuperó al reducir su concentración en el medio. Así mismo, aunque estos periodos fueron operados bajo distintas condiciones de TRC y OLR (Tabla 3.4, Pág. 104), ambos fueron alimentados con microalgas concentradas hasta una DQO de alrededor de $20000 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabla 4.12), la cual fue aproximadamente igual a la concentración de las microalgas alimentadas en el estudio de inhibición (periodo T-VI) cuando se estableció la OLR en $0.6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. Dado que el inicio de la inhibición se detectó en los últimos 10 días en los que se mantuvo la OLR en $0.6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ en el periodo T-VI, se puede concluir que la digestión anaerobia de microalgas en un CSTR termófilo no es capaz de operar con concentraciones de biomasa algal que alcancen los $20000 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ sin que el proceso se vea afectado por la presencia de amoníaco.

Tras el estudio de inhibición en continuo, se realizó un estudio de inhibición en *batch* a 55°C en el que se evaluó la actividad metanogénica del fango del reactor CSTR

termófilo en presencia de distintas concentraciones de amoníaco, con el fin de cuantificar el porcentaje de inhibición por amoníaco que se produjo en el reactor

Para llevar a cabo este estudio se realizaron 9 ensayos en paralelo y por duplicado, en los que se empleó como inóculo el fango procedente del CSTR termófilo, y como sustrato una disolución de acetato con una concentración de DQO de $2000 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. En cada ensayo, el amonio se fue incrementando con respecto a su concentración inicial en el fango, desde 0% hasta 130% mediante la adición de NH_4Cl , tal y como se describe en el apartado 3.3.2 de Materiales y métodos (Pág. 103), calculando la concentración de amoníaco correspondiente mediante la ecuación 3.18.

La Figura 4.27a muestra la influencia de la concentración de amoníaco sobre la actividad metanogénica y la Figura 4.27b presenta la relación existente entre la actividad metanogénica y el porcentaje de acetato que finalmente se transformó en metano en cada uno de los ensayos. Así mismo, la Tabla 4.19 muestra el porcentaje de amonio incrementado con respecto a la concentración inicial del inóculo junto, con el amoníaco y la SMA alcanzados en cada ensayo.

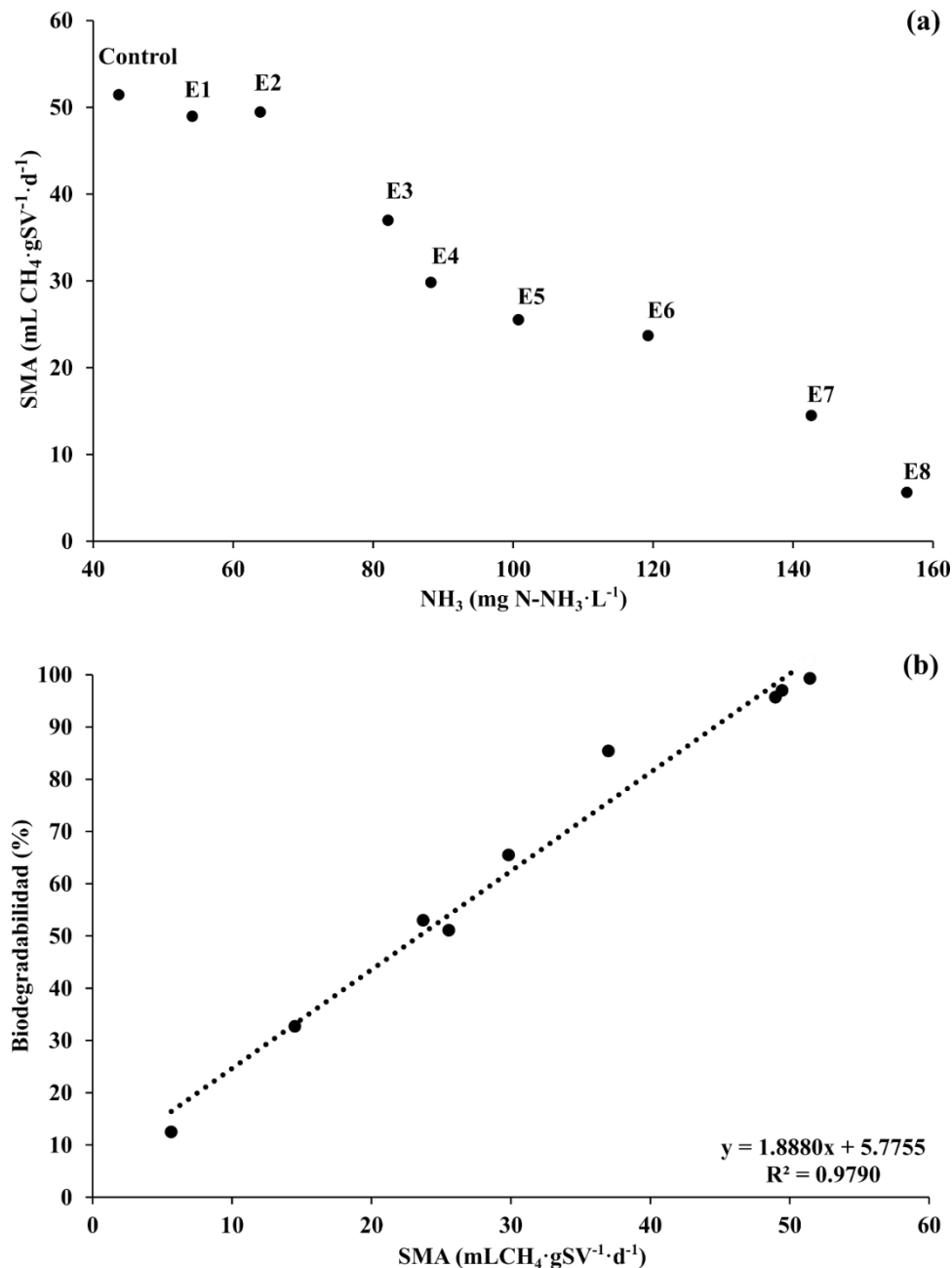


Figura 4.27. Actividad metanogénica del fango procedente del CSTR termófilo en función de la concentración de amoníaco (a) y su relación con la biometanización del acetato alcanzada tras 20 días (b) en cada ensayo.

Tabla 4.19. Amonio añadido, concentración de amoniaco inicial (control) y alcanzada y actividad metanogénica del fango procedente del CSTR termófilo en cada uno de los ensayos realizados, en términos de media \pm desviación estándar.

Experimento	Incremento de N-NH ₄ (%)	NH ₃ (mgN-NH ₃ ·L ⁻¹)	SMA (mLCH ₄ ·gSV ⁻¹ ·d ⁻¹)	Inhibición (%) ⁽¹⁾
Control	0%	43.63 \pm 1.65	51.46 \pm 1.34	-
E1	10%	54.15 \pm 1.45	48.98 \pm 1.65	4.8
E2	20%	63.86 \pm 0.08	49.46 \pm 1.98	3.9
E3	30%	82.12 \pm 1.57	37.00 \pm 1.05	28.1
E4	40%	88.25 \pm 0.30	29.84 \pm 1.15	42.0
E5	60%	100.75 \pm 0.21	25.55 \pm 0.91	50.4
E6	80%	119.27 \pm 1.74	23.71 \pm 1.36	53.9
E7	100%	142.60 \pm 2.88	14.51 \pm 1.47	71.8
E8	130%	156.25 \pm 1.84	5.64 \pm 0.99	89.0

⁽¹⁾ Porcentaje calculado con respecto al ensayo control.

Como puede verse en la Figura 4.27a, un incremento de la concentración de amonio del 10% y el 20%, ambas correspondientes a una concentración de amoniaco inferior a los 65 mgN-NH₃·L⁻¹ (Tabla 4.19), no afectó significativamente a la actividad metanogénica puesto que el valor de SMA resultante de estos dos ensayos (E1 y E2) no presentó una gran variación con respecto a la SMA máxima de 51.46 mLCH₄·gSV⁻¹·d⁻¹, obtenida del ensayo Control, al que no se le añadió amonio. Sin embargo, en el ensayo E3 en el que se alcanzó una concentración de amoniaco de 82.12 mgN-NH₃·L⁻¹, la SMA se redujo hasta 37.00 mLCH₄·gSV⁻¹·d⁻¹ correspondiéndose con una inhibición del proceso biológico de 28.1% (Figura 4.27a, Tabla 4.19). A su vez, se observó que no sólo la tasa de producción de metano se vio afectada por la inhibición, sino también la conversión final del acetato a metano, reduciéndose la biodegradación de este sustrato fácilmente asimilable hasta el 85.4%

(Figura 4.27b) tras los 20 días de ensayos. Este resultado concuerda con el obtenido durante la experimentación del reactor CSTR y el estudio de inhibición en continuo, donde se apreció que el proceso empezaba a inhibirse a partir de una concentración de amoníaco de $70 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.

A medida que se incrementó la concentración de amoníaco en los sucesivos ensayos, la inhibición de los microorganismos metanógenos se hizo más acusada. Así pues, en el ensayo E8 en el que se alcanzó una concentración de amoníaco de $156.25 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, la SMA se redujo hasta $5.64 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Figura 4.27a, Tabla 4.19), equivalente al 89.0% de inhibición. Así mismo, la biodegradación del acetato también se vio afectada, disminuyendo la capacidad del proceso de transformarlo en metano hasta el 12.5% (Figura 4.27b).

Esta fuerte inhibición del proceso detectada en el ensayo E8, confirma el resultado obtenido del estudio de inhibición en continuo realizado en el periodo T-VI, en el que se observó que a partir de una concentración de amoníaco de $150 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, la producción de biogás empezaba descender y el proceso exhibió signos de una inhibición muy elevada (Figura 4.23, Pág. 202). La concordancia entre los resultados obtenidos en *batch* y en continuo permite que se pueda establecer una relación entre ellos para cuantificar el efecto del amoníaco sobre la actividad metanogénica durante la experimentación realizada en el CSTR termófilo, a partir de los datos obtenidos de los ensayos de inhibición en *batch*. La cuantificación del efecto del amoníaco se llevó a cabo realizando el ajuste de la concentración de NH_3 y la SMA, obtenidos en los ensayos, a una función de inhibición de tipo Hill (Ec. 4.7),

$$y = \frac{K^n}{K^n + S^n} \quad [\text{Ec. 4.7}]$$

donde y se corresponde con la actividad metanogénica normalizada con respecto a la máxima ($\% \text{SMA}_{\text{máxima}}$), K es la constante de inhibición ($\text{mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), S es la

concentración de amoníaco en el proceso ($\text{mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$) y n es el coeficiente de Hill obtenido del ajuste.

En la Figura 4.28 se representan los valores experimentales resultantes de los ensayos en *batch* junto con los obtenidos de la función de inhibición de Hill, ajustada con un valor de $104 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para la constante de inhibición por amoníaco y $n = 4$ para el coeficiente de Hill. En esta figura se observa que la función de Hill describe adecuadamente el comportamiento observado experimentalmente, ya que se obtuvo un coeficiente de regresión (R^2) de 0.9562 (Figura 4.28).

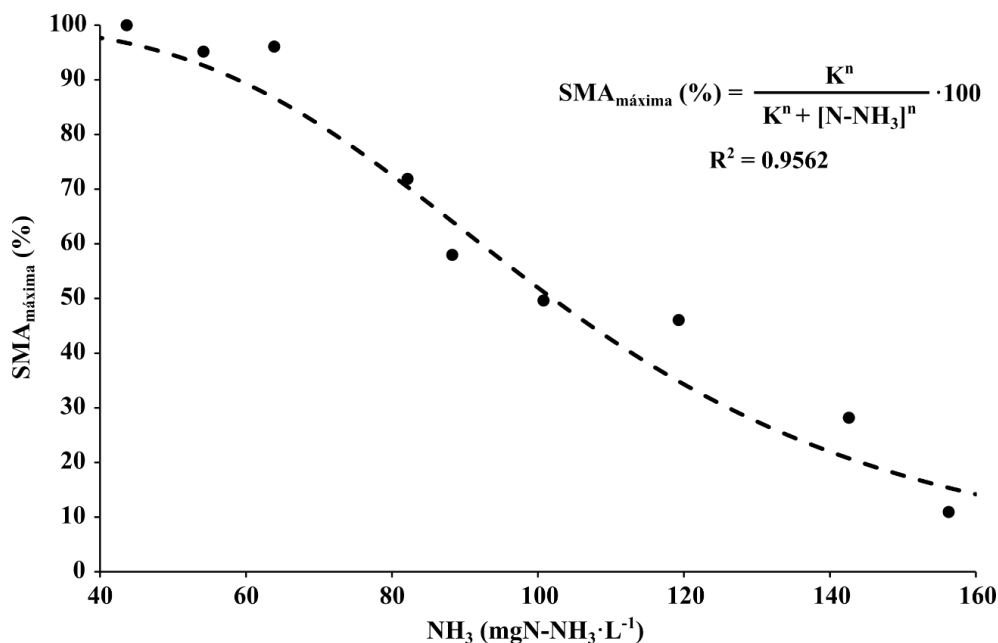


Figura 4.28. Ajuste de la concentración de amoníaco y su correspondiente actividad metanogénica normalizada con respecto a la SMA máxima a una función de inhibición de tipo Hill.

Mediante la ecuación obtenida se estimó que una concentración de $70 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$, a partir de la cual el proceso en el CSTR termófilo empezaba a inhibirse, reduce la SMA máxima hasta el 83.0% (17.0% de inhibición). Así mismo, una concentración

de $150 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, la cual dio lugar a una fuerte inhibición en el periodo T-VI del CSTR termófilo, reduce la SMA máxima hasta el 18.8% (81.2% de inhibición). En la Tabla 4.20 se muestra el porcentaje de SMA máxima calculado a partir del ajuste, para cada concentración promedio de amoníaco, obtenida en los periodos en los que se alcanzó el estado pseudo-estacionario.

Tabla 4.20. Porcentaje de la SMA máxima e inhibición alcanzados en función de la concentración de amoníaco para cada uno de los periodos pseudo-estacionarios estudiados.

Periodo	NH_3 ($\text{mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	SMA _{máxima} (%) ⁽¹⁾	Inhibición (%) ⁽²⁾
T-I	19.69	99.9	0.1
T-II	71.66	81.6	18.4
T-III	62.23	88.6	11.4
T-IV	99.12	54.8	45.2
T-V	42.26	97.4	2.7

⁽¹⁾ Calculado a partir del ajuste de los datos experimentales a una función de tipo Hill.

⁽²⁾ Calculado como $(100 - \% \text{SMA}_{\text{máxima}})$

En esta tabla se observa que en los periodos T-II y T-IV, el porcentaje de inhibición resultó en un 18.4% y 45.2% respectivamente, corroborando que en estos periodos se alcanzó un estado pseudo-estacionario inhibido en el que el proceso se mantuvo bajo condiciones estables pero con un rendimiento de producción de metano reducido, y confirmando que la eficiencia del proceso se incrementaría si se redujera o eliminara por completo esta inhibición.

4.3.7. Conclusiones de la digestión anaerobia termófila de biomasa algal

El estudio de digestión anaerobia de microalgas en un reactor CSTR termófilo, confirmó el efecto positivo que tiene la temperatura de operación sobre la biodegradación de la biomasa algal, ya que la elevada actividad hidrolítica de los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia termófila produce un

incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal del 20.4% con respecto a su digestión anaerobia a 35°C y bajo las mismas condiciones operacionales. Así mismo, se corroboró que la concentración de microalgas en el alimento es uno de los factores de mayor influencia en el rendimiento del proceso, puesto que una concentración de microalgas de alrededor de 20000 mgO₂·L⁻¹ en el influente combinada con esta mayor actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos, produjo la liberación de altas concentraciones de amonio que dieron lugar a la inhibición parcial del proceso por amoniaco. Por ello, la selección de una adecuada configuración de reactor cobra una especial relevancia. La implementación de un sistema físico de separación acoplado al CSTR, permitiría operar el reactor a altos TRCs y bajas OLRs alimentando microalgas más diluidas, lo que maximizaría la producción de biogás, reduciría la producción de fangos y potenciaría a su vez la recuperación de nutrientes del efluente. A su vez, esta recuperación de nutrientes se podría incrementar minimizando la precipitación incontrolada de fósforo en el interior del reactor mediante la reducción de calcio en el influente o la alimentación de microalgas más diluidas, de la misma forma que en el estudio llevado a cabo en condiciones mesófilas.

Se observó que la inhibición del proceso por amoniaco empezaba a producirse a partir de una concentración de amoniaco de 70 mgN-NH₃·L⁻¹, siendo la inhibición inferior al 30% para una concentración de 82.12 mgN-NH₃·L⁻¹ y alcanzando el 89% en para valores de 156.25 mgN-NH₃·L⁻¹. Dada la variabilidad que presenta la bibliografía sobre las concentraciones de amoniaco que producen inhibición, éstas deben ser evaluadas para cada proceso biológico en concreto.

Los resultados obtenidos sugieren que deberían llevarse a cabo futuros estudios en los que se evitara la inhibición de la digestión anaerobia termófila, para maximizar la producción de biogás, tales como llevar a cabo el proceso bajo una configuración AnMBR o realizar una co-digestión de las microalgas con un co-sustrato que tenga

un bajo contenido en nitrógeno como el fango procedente de la decantación primaria de una EDAR o la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

4.4. Caracterización de las poblaciones microbianas durante la digestión anaerobia de microalgas

En la presente tesis, se han llevado a cabo dos estrategias para maximizar la valorización energética de microalgas sin pretratar en forma de biogás, en reactores en continuo: la digestión anaerobia de la biomasa algal (i) a elevados TRCs en un AnMBR mesófilo y (ii) a elevada temperatura en un CSTR termófilo. Ambas estrategias se realizaron para incrementar el potencial hidrolítico de la biomasa anaerobia ya que la resistencia a la biodegradación que presentan las microalgas, debido a la pared celular que constituye su estructura, convierte a la hidrólisis en la etapa limitante del proceso anaerobio. Por ello, la caracterización del consorcio de microorganismos capaces de degradar la biomasa algal, permite corroborar la hipótesis de que ambas estrategias dan lugar al desarrollo de una población microbiana fuertemente hidrolítica. Así mismo, dicha caracterización proporciona una valiosa información para la optimización del proceso, puesto que permite conocer los microorganismos que deben ser potenciados para obtener una elevada eficiencia del proceso bajo condiciones mesófilas, así como aquellos que se desarrollan en condiciones termófilas y en ausencia de inhibición.

Así pues, la composición de la comunidad microbiana fue caracterizada durante el estado pseudo-estacionario de los periodos M-IV y T-V, estudiados en el reactor AnMBR mesófilo y CSTR termófilo respectivamente. Para ello, se tomaron cinco muestras de ambos reactores en intervalos de tiempo semanales, cogiéndose dichas muestras los días 534, 543, 551, 563 y 571 en el reactor mesófilo y los días 709, 717, 724, 735 y 745 en el reactor termófilo. Dado que los reactores fueron muestreados durante periodos experimentales en los que exhibieron estabilidad, las muestras fueron consideradas como réplicas biológicas del periodo. Durante el mismo espacio de tiempo, se tomaron 4 muestras de las microalgas alimentadas a los reactores, dos del alimento del reactor mesófilo y dos del alimento del termófilo. Sin embargo,

aunque el alimento fue muestreado durante el mismo periodo que los reactores, las muestras pertenecieron al mismo *batch* de microalgas concentradas, por lo que se consideran réplicas técnicas. El análisis del alimento se realizó porque las microalgas no provienen de un cultivo puro por lo que, a pesar de que estuvieron mayoritariamente compuestas por *Scenedesmus* spp. (>90%), también contienen una proporción minoritaria de microorganismos (<10%) que podrían influir sobre la comunidad bacteriana desarrollada en los reactores.

A continuación, en la Figura 4.29 se representa la abundancia relativa de los microorganismos que componen las muestras a nivel de phylum, en la Figura 4.30 se muestra esta composición microbiana a nivel de género y en Tabla 4.21 se muestra un resumen de los géneros de Bacteria y Archaea más abundantes en cada reactor, y en la biomasa procariota analizada en el alimento mediante la secuenciación del gen ARNr 16S.

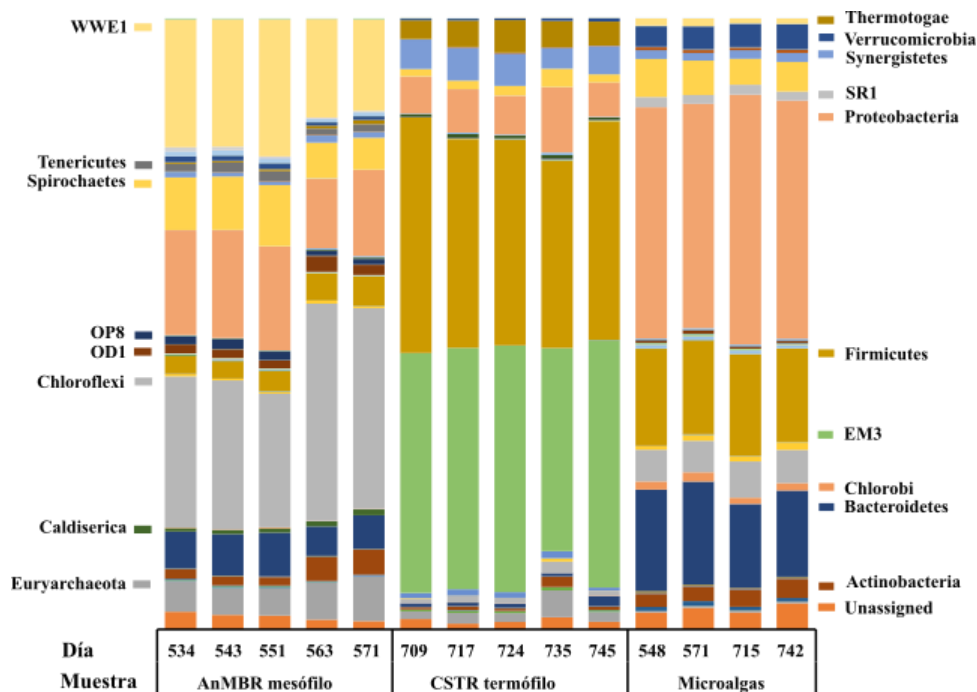


Figura 4.29. Abundancia relativa de bacterias y archaeas a nivel de phylum. Los grupos taxonómicos con una abundancia relativa inferior al 1% han sido excluidos de la leyenda.

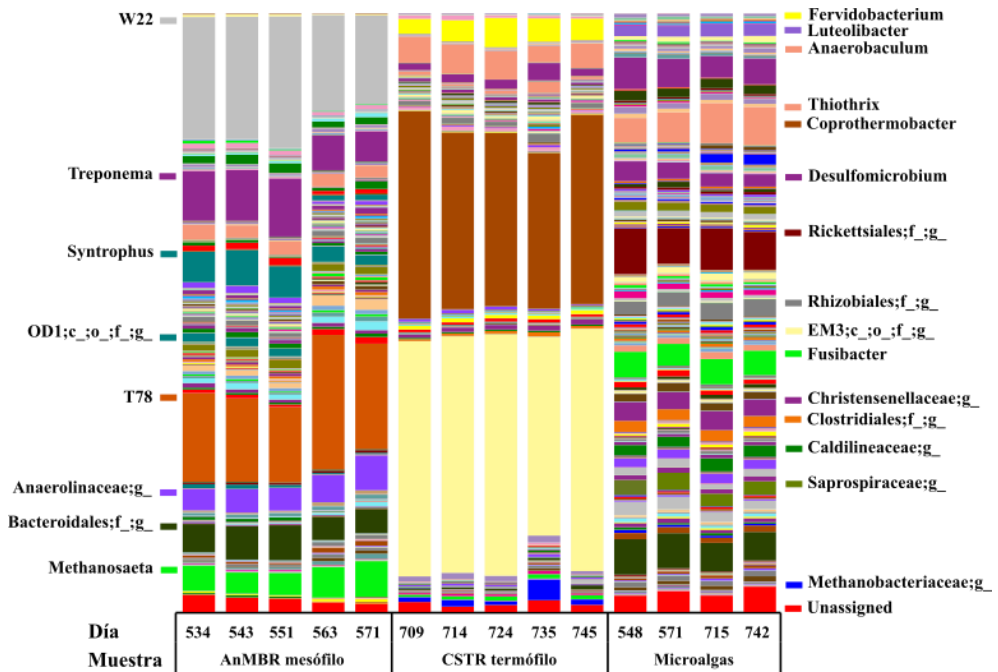


Figura 4.30. Abundancia relativa de bacterias y archaeas a nivel de género. Los grupos taxonómicos con una abundancia relativa inferior al 1% han sido excluidos de la leyenda.

Tabla 4.21. Géneros de bacterias y archaeas más abundantes en el AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y las microalgas.

AnMBR mesófilo					
Domino Bacteria (92.50%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
WWE1	Cloacamonae	Cloacamonales	Cloacamonaceae	W22	18.67
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolinaceae	T78	16.27
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolinaceae		4.33
Chloroflexi	Anaerolineae	GCA004			1.03
Chloroflexi	Anaerolineae	SJA-15			1.25
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	7.47
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			4.81
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i>	3.59
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichale	Thiotrichaceae	<i>Thiothrix</i>	2.17
OD1					1.65
Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>	1.31
Firmicutes	Clostridia	SHA-98			1.03
Dominio Archaea (5.39%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	4.49
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales			0.30
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	WSA2		0.19
CSTR termófilo					
Dominio Bacteria (96.49%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
EM3					38.56
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermodesulfobiaceae	<i>Coprothermobacter</i>	30.10
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae		0.76
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>	0.62
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae		0.46
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Anaerobaculaceae	<i>Anaerobaculum</i>	4.22
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Dethiosulfovibrionaceae	PD-UASB-13	0.15
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>Fervidobacterium</i>	3.68
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	S1	0.51
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	1.62
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			0.88
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	<i>Thiothrix</i>	0.74
Dominio Archaea (2.09%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae		1.39
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	0.62
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	0.05

Tabla 4.21 (Continuación). Géneros de bacterias y archaeas más abundantes en el AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y las microalgas.

Microalgas					
Dominio Bacteria (96.38%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales			6.69
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	<i>Thiothrix</i>	5.57
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfomicrobiaceae	<i>Desulfomicrobium</i>	2.60
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			2.49
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			5.33
Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Saprospiraceae		2.45
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	4.49
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Acidaminobacteraceae	<i>Fusibacter</i>	4.05
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae		3.00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			1.85
Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineales	Caldilineaceae		1.86
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Luteolibacter</i>	1.85
Dominio Archaea (0.28%)					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae		0.13
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	0.09

A partir de estos resultados, se evaluará si los microorganismos presentes en el alimento alteraron la población microbiana de los reactores, así como la capacidad hidrolítica de los microorganismos involucrados en ambos procesos y su relación con los resultados obtenidos en los periodos experimentales muestreados.

4.4.1. Análisis de diversidad y similitud de las comunidades microbianas

Con el resultado obtenido del análisis genómico de todas las muestras, se realizó el análisis de la biodiversidad para evaluar las diferencias existentes entre las distintas muestras a nivel microbiológico, así como la influencia de los microorganismos procariotas del alimento sobre la comunidad microbiana de ambos reactores. El análisis de biodiversidad permite conocer el número de especies que conforman una

muestra y su distribución en la misma de forma que, cuanto mayor sea la biodiversidad en los reactores, mayor capacidad hidrolítica tendrá el proceso puesto que se incrementa la variedad de microorganismos capaces de degradar los distintos componentes de la biomasa algal.

La Figura 4.31 muestra el número de OTU_{0.97} (agrupación de secuencias que comparten un 97% de similitud) detectado en cada grupo de muestras analizadas, mientras que la Tabla 4.22 se presenta el valor medio de las OTUs observadas en cada grupo de muestras así como el de los distintos índices de diversidad, calculados según se detalla en el apartado 3.6 de Materiales y métodos (Pág. 117).

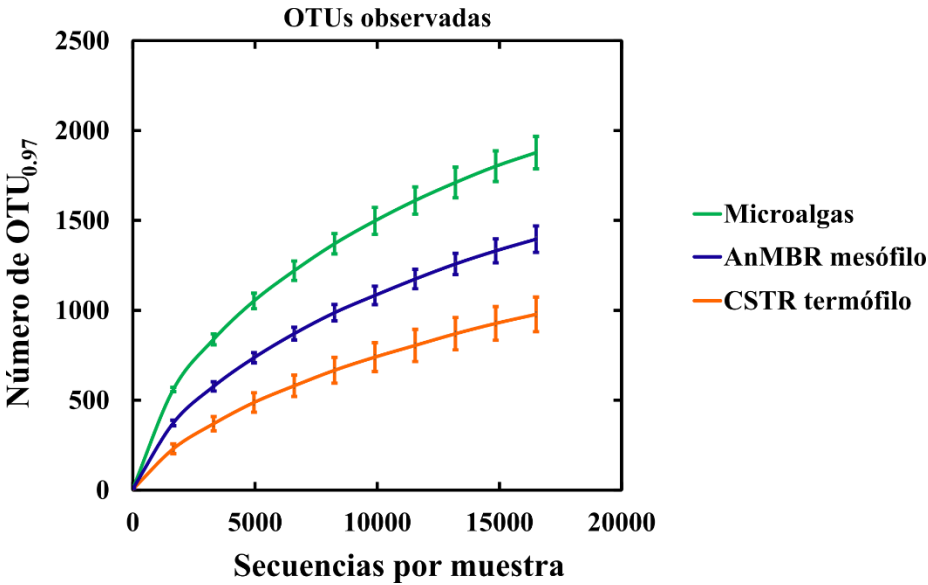


Figura 4.31. Riqueza de la comunidad microbiana presente en ambos reactores y en la biomasa algal alimentada, expresada como el número de OTU_{0.97} observadas, tras el análisis de la secuenciación del gen 16S. Las barras representan el error estándar (SE) calculado para cada grupo de muestras, microalgas, AnMBR mesófilo y CSTR termófilo.

Tabla 4.22. Media \pm error estándar de los índices de diversidad obtenidos del reactor AnMBR mesófilo y el CSTR termófilo, ambos alimentados con *Scenedesmus*.

	AnMBR mesófilo	CSTR termófilo
Simpson	0.012 ± 0.001	0.050 ± 0.005
Shannon	6.518 ± 0.168	4.039 ± 0.396
Gini	0.987 ± 0.002	0.971 ± 0.003
OTUs observadas	1396 ± 73	977 ± 96

En la Figura 4.31 se aprecia que el reactor mesófilo exhibió una mayor riqueza en número de OTUs que el reactor termófilo, alcanzando un valor de 1396 OTUs que fue 1.4 veces superior que el obtenido en el CSTR termófilo (Tabla 4.22). Esto se debe principalmente a dos factores: el distinto TRC establecido en ambos reactores (100 días en el AnMBR mesófilo y 35 días en el CSTR termófilo) y la temperatura de operación, siendo la temperatura uno de los factores más restrictivos de la biodiversidad, puesto que no todos los microorganismos son capaces de sobrevivir a 55°C. Este resultado coincide con estudios previamente reportados por Vanwonterghem et al. (2015), quienes detectaron una baja biodiversidad durante el tratamiento anaerobio de celulosa en condiciones termófilas, y por Li et al. (2014) quienes demostraron que la temperatura es uno de los factores más influyentes en la distribución de la población microbiana.

A su vez, el resto de índices de diversidad, calculados para evaluar tanto la riqueza de la muestra como la igualdad de distribución de los microorganismos, confirmaron la alta biodiversidad del AnMBR mesófilo. Dado que una comunidad microbiana presenta una mayor biodiversidad cuanto mayor es su riqueza en microorganismos y la homogeneidad de su distribución, el menor valor del índice de Simpson obtenido en el AnMBR junto con los mayores índices de Shannon y Gini (Tabla 4.22), demuestran dicha elevada biodiversidad.

Sin embargo, fueron las muestras de biomasa algal las que exhibieron la mayor riqueza de OTUs (Figura 4.31), debido a que no provienen de un cultivo de microalgas puro sino que contienen una baja proporción de bacterias y archaeas (<10%). Por ello, se hace necesario conocer la semejanza filogenética entre los tres tipos de muestras analizadas para evaluar la influencia de los microorganismos presentes en el alimento sobre la comunidad microbiana de los reactores. Para tal fin, en la Figura 4.32 se muestra el porcentaje de microorganismos identificados que comparten las muestras mediante un diagrama de Venn, en la Figura 4.33a se muestra el análisis de PCoA realizado para ver cómo se distribuyen las muestras en función de su composición microbiana, y en la Figura 4.33b se muestra el análisis de PCA realizado para conocer dicha distribución en función de las características ambientales establecidas en los reactores y en el alimento.

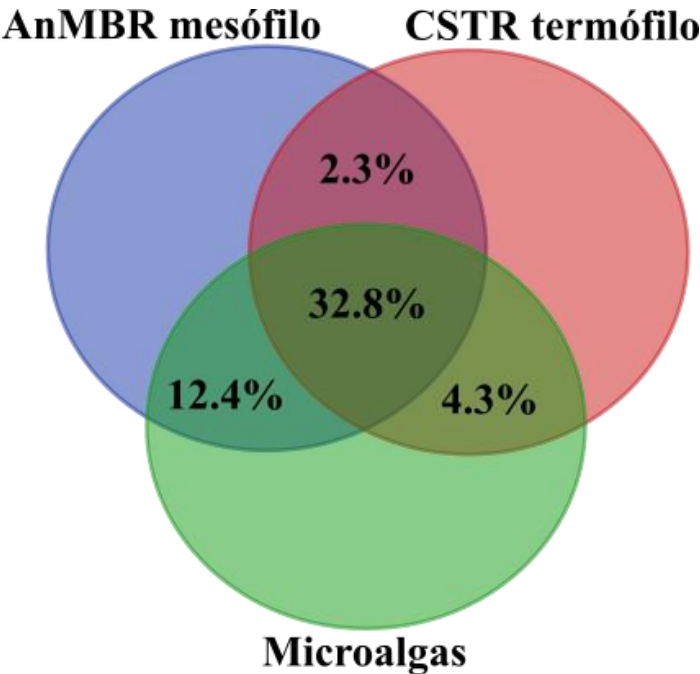


Figura 4.32. Porcentaje de microorganismos que comparten las muestras analizadas (AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y la biomasa algal) con respecto a los identificados en la biomasa algal, representada mediante un diagrama de Venn.

En la Figura 4.32 se muestra que el 12.4% de los microorganismos identificados en la biomasa algal también fueron encontrados en las muestras del AnMBR mesófilo, mientras que solo compartió el 4.3% de los microorganismos identificados en las muestras del CSTR termófilo. Sin embargo, pese a que ciertos microorganismos procariotas del alimento también se encuentran presentes en ambos reactores, estos exhiben distinta distribución en los tres tipos de muestras, tal y como se observa en la Figura 4.29 y la Figura 4.30, de forma que las especies más abundantes en los reactores distan mucho de las de mayor abundancia relativa en la biomasa algal (Tabla 4.21).

Así mismo, como puede verse en la Figura 4.33a, las muestras de biomasa algal se agruparon de una forma marcadamente distinta de las muestras procedentes de los reactores, indicando que las comunidades microbianas eran totalmente distintas y que ambos reactores no se vieron influenciados por las poblaciones de bacterias y archaeas presentes en el alimento, sino que son el resultado de las condiciones ambientales únicas existentes en cada reactor, tal y como muestra también la Figura 4.33b. De las condiciones presentes en los reactores, aunque existen numerosas variables que difieren entre ambos, la temperatura operacional es el factor clave que determina las especies que pueden prosperar (Li et al., 2014).

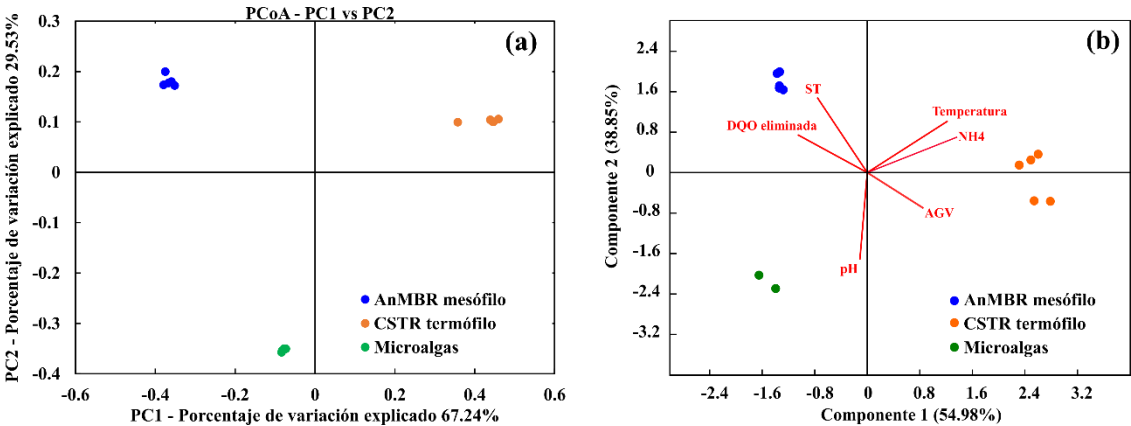


Figura 4.33. Análisis de la matriz de distancias de las comunidades microbianas mediante PCoA (a) y análisis de los parámetros del proceso, listados como vectores (rojo), mediante PCA (b) para el reactor AnMBR mesofílico, el CSTR termofílico y las microalgas empleadas como sustrato.

A su vez, esta significativa disimilitud entre ambos reactores y la biomasa algal fue corroborada mediante el test estadístico ANOSIM. En la Figura 4.34, en la que se muestra el resultado gráfico del test ANOSIM, puede observarse cómo la caja que representa la variabilidad entre los grupos muestreados (AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y microalgas) indica que existe una notable diferencia entre ellos, si se compara con las cajas que representan la variabilidad dentro de cada uno de los grupos.

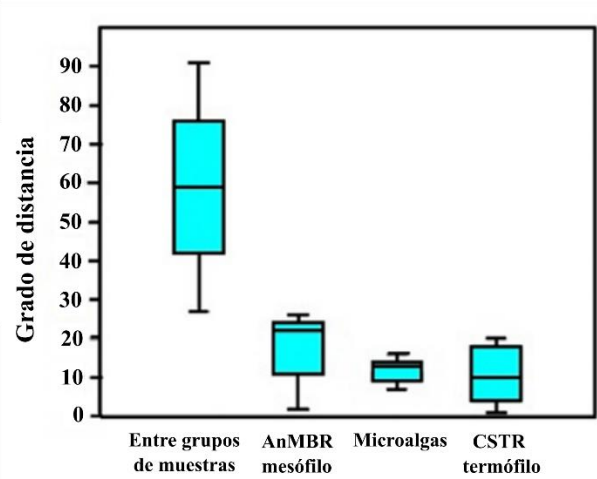


Figura 4.34. Análisis estadístico de similitud (ANOSIM), realizado a partir de la matriz de distancia euclídea, que representa la distancia entre grupos e inter-grupos de las muestras del AnMBR mesófilo, el CSTR termófilo y las microalgas.

Por consiguiente, el estadístico R obtenido del test ANOSIM mostrado en la Tabla 4.23, indica que la similitud dentro de cada grupo es muy superior a la similitud entre grupos, confirmando la significativa diferencia en la composición de cada uno de los reactores y la biomasa algal alimentada.

Tabla 4.23. Matriz de valores del estadístico R obtenida del test ANOSIM.

	AnMBR mesófilo	CSTR termófilo	Microalgas
AnMBR mesófilo	-	1.00	1.00
CSTR termófilo	1.00	-	1.00
Microalgas	1.00	1.00	-

4.4.2. Composición de la comunidad microbiana del reactor AnMBR mesófilo

El conocimiento de los microorganismos que componen la biomasa anaerobia en el AnMBR mesófilo son de especial importancia, puesto que en el periodo muestreado se alcanzó una de las mayores biodegradabilidades reportadas hasta el momento. Por ello, conocer los microorganismos que son capaces de dar lugar a esta biodegradabilidad proporciona una valiosa información sobre el proceso.

El análisis de la comunidad microbiana en este reactor reveló que Chloroflexi (27.9%), WWE1 (19.0%) and Proteobacteria (15.4%) fueron los phyla más abundantes en el dominio Bacteria, seguidos por Spirochaetes (7.7%), Bacteroidetes (5.9%) y Firmicutes (3.6%), tal y como se muestra en la Figura 4.29. Generalmente, estos phyla son abundantes en los sistemas anaerobios (Rivière et al., 2009; Sundberg et al., 2013), aunque la dominancia de cada phylum vendrá dada por el

sustrato a degradar y las condiciones operacionales establecidas (González-Fernández et al., 2015). El phylum Chloroflexi se compuso mayoritariamente por la división candidata T78, perteneciente a la familia Anaerolinaceae (Figura 4.30, Tabla 4.21). La elevada abundancia de Chloroflexi en la digestión anaerobia indica que este phylum juega un papel importante en el proceso. Además, dicha abundancia se encuentra relacionada con la concentración de amonio en el AnMBR mesófilo (Figura 4.17), ya que este phylum predomina a bajas concentraciones de NH_4^+ (Zamanzadeh et al., 2016). En concreto, el microorganismo T78 está involucrado en la degradación de carbohidratos como sustrato para su crecimiento (St-Pierre and Wright, 2014) y es capaz de degradar biomasa lignocelulósica (Mbarki et al., 2016), ambos constituyentes de las microalgas.

El phylum WWE1 se compuso casi en su totalidad por el microorganismo W22, perteneciente a la familia Cloacamonaceae, el cual exhibe una similitud superior al 99% con *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* (Ju and Zhang, 2014). W22 es una bacteria fermentativa que obtiene su energía principalmente de la fermentación de aminoácidos para producir CO_2 y H_2 , así como de la fermentación de azúcares para generar acetato. Por lo tanto, esta bacteria está probablemente involucrada en un metabolismo sintrófico con microorganismos consumidores de hidrógeno, tales como los metanógenos, las bacterias sulfato-reductoras o las acetogénicas (Ju and Zhang, 2014; Solli et al., 2014; Wirth et al., 2012), pudiendo contribuir tanto a la metanogénesis acetoclástica como a la hidrogenotrófica. La elevada presencia de *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* en el AnMBR mesófilo puede estar relacionada con la hidrólisis de la celulosa y las proteínas, ambos constituyentes de la estructura de las microalgas *Scenedesmus* (Biller and Ross, 2014), en azúcares y aminoácidos respectivamente.

El phylum Proteobacteria se compuso del género *Syntrophus*, perteneciente a la clase Deltaproteobacteria (Figura 4.30, Tabla 4.21). Esta es una de las bacterias más abundante en los procesos de digestión anaerobia debido a su habilidad para oxidar

sintróficamente propionato a acetato, el cual es usado posteriormente por los metanógenos acetoclásticos (Ariesyady et al., 2007). Así mismo, las bacterias pertenecientes al phylum Bacteroidetes también juegan un papel importante en la degradación de celulosa y proteínas para dar lugar a propionato y acetato como productos de la fermentación (Hatamoto et al., 2014; Kampmann et al., 2012; Rivière et al., 2009). Sin embargo, la abundancia relativa detectada de este phylum en el AnMBR mesófilo es inferior a la previamente reportada en otros estudios (Yang et al., 2014). El phylum Spirochaetes contiene bacterias consumidoras de metabolitos intermedios como la glucosa (Ariesyady et al., 2007) y las bacterias pertenecientes al phylum Firmicutes presentan la habilidad de degradar compuestos orgánicos como los polisacáridos (Jaenicke et al., 2011). No obstante, la abundancia de estos phyla también es inferior a la detectada en previos estudios (Kampmann et al., 2012; Nelson et al., 2011), lo cual podría estar relacionado con el sustrato, la baja concentración en el medio de NH_4^+ que beneficia el crecimiento de Chloroflexi y la operación del reactor a elevado TRC gracias al uso de la tecnología de membrana, ya que permite retener microorganismos de lento crecimiento como Chloroflexi (Yamada and Sekiguchi, 2009; Yamada et al., 2005) o los metanógenos (Yu et al., 2016).

Como se ha mostrado, el reactor AnMBR mesófilo exhibe una elevada diversidad de phyla con capacidades celulolíticas y proteolíticas, los cuales son responsables de la degradación de la biomasa algal y explican la elevada eliminación de materia orgánica alcanzada este reactor (Figura 4.11b, Tabla 4.9). La abundancia relativa de estos phyla detectados difiere bastante a los reportados en otros estudios sobre la digestión anaerobia de microalgas. Mientras Bacteroidetes fue detectado como el phylum dominante en un CSTR mesófilo tratando *Scenedesmus obliquus* (Wirth et al., 2015), Sanz et al. (2017) detectaron que Proteobacteria era el phylum más abundante durante la degradación anaerobia de *Chlorella vulgaris* en un CSTR

mesófilo. Sin embargo, ninguno de estos phyla fueron los dominantes en el AnMBR mesófilo empleado en la presente tesis.

Además, el AnMBR mesófilo dio lugar a una mayor diversidad microbiana que la observada en otros digestores de microalgas. El índice de Simpson (Tabla 4.21), el cual refleja tanto el número de especies como la uniformidad de su distribución de abundancia en una muestra, fue inferior al reportado por Seo et al. (2016) durante la digestión anaerobia de un residuo microalgal del género *Ettlia* sp. en un CSTR mesófilo, y no solo el índice de Simpson sino también los índices de Shannon y Gini demostraron una mayor diversidad en el AnMBR mesófilo que los reportados por Sanz et al. (2017) durante la digestión anaerobia de *Chlorella vulgaris* en un CSTR mesófilo (0.09, 3.93 y 0.93, respectivamente). Estos resultados muestran que un reactor mesófilo operado a elevados TRC mediante el uso de membranas, promueven la retención de microorganismos con baja velocidad de crecimiento, lo cual crea una comunidad microbiana única capaz de degradar las microalgas *Scenedesmus* spp., dando lugar a una de las mayores producciones de biogás, a partir de la digestión anaerobia de *Scenedesmus* spp. cultivadas en agua residual, reportadas hasta el momento.

En cuanto al dominio Archaea, el phylum Euryarchaeota constituyó el 5.4 % de todas las secuencias (Tabla 4.21) y estuvo mayoritariamente compuesto por el género *Methanosaeta*, perteneciente al orden Methanosarcinales (83.6%), mientras que Methanobacteriales y Methanomicrobiales constituyeron el 7.4% y 5.6%, de este phylum respectivamente (Tabla 4.21). *Methanosaeta* son metanógenos acetoclásticos cuya elevada abundancia es indicador de que la ruta predominante para producir metano es la vía acetoclástica. Este resultado concuerda con la elevada presencia de los phyla Chloroflexi, WWE1 y Proteobacteria, y la ausencia de VFA en el efluente de este reactor (Figura 4.12). Sin embargo, aunque en menor medida, la metanogénesis hidrogenotrófica también contribuye a la producción de metano, ya que la presencia de Methanobacteriales y Methanomicrobiales, y el conocido

metabolismo sintrófico de *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* sugieren la presencia de esta ruta metabólica en el proceso. Estos resultados contrastan con los reportados por Yu et al. (2016), quienes encontraron que la ruta hidrogenotrófica fue la dominante en un AnMBR mesófilo digiriendo fango activado. No obstante, Ellis et al. (2012) detectaron que la metanogénesis acetoclástica fue el principal mecanismo de producción de metano durante la degradación anaerobia de biomasa algal en un CSTR mesófilo, mientras que Wirth et al. (2015) y Nolla-Ardèvol et al. (2015) detectaron *Methanosarcina* como la archaea más abundante en un CSTR mesófilo tratando *Scenedesmus obliquus* y *Spirulina*, respectivamente. Estos resultados parecen indicar que el metabolismo metanogénico es determinado por características del proceso como la concentración de amonio y amoníaco y la temperatura, en mayor medida que por el sustrato empleado o la configuración del reactor.

4.4.3. Composición de la comunidad microbiana en el reactor CSTR termófilo

En el reactor CSTR termófilo, EM3 (38.7%) y Firmicutes (34.6%) fueron los phyla dominantes, seguidos por Proteobacteria (7.2%), Synergistetes (4.7%) y Thermotogae (4.2%), como se muestra en la Figura 4.29. Firmicutes es uno de los phyla más frecuentemente observados en digestores termófilos debido a su habilidad para hidrolizar proteínas y polisacáridos (Jaenicke et al., 2011). Este phylum fue compuesto en un 94.3% por la clase Clostridia, constituida en su mayoría por el género *Coprothermobacter* (Figura 4.30 y Tabla 4.21). La clase Clostridia abarca un rango de bacterias, capaces de degradar la celulosa y oxidar sintróficamente acetato, las cuales se desarrollan en digestores con elevadas concentraciones de amonio (Dai et al., 2016), tales como los niveles alcanzados en el CSTR termófilo (Figura 4.23b, Tabla 4.16). Las bacterias pertenecientes a la clase Clostridia normalmente coexisten con metanógenos hidrogenotróficos, los cuales mantienen

baja la concentración de H_2 evitando así la inhibición del proceso (Wirth et al., 2012). En concreto, el género *Coprothermobacter* es una bacteria termófila con una elevada actividad proteolítica, capaz de degradar las proteínas en acetato, H_2 y CO_2 (Sasaki et al., 2011). Por ello, su presencia puede relacionarse con su habilidad para degradar los componentes de la biomasa algal. Las microalgas *Scenedesmus* tienen una elevada proporción de proteínas y celulosa (Chng et al., 2016; Voigt et al., 2014), lo que explica la elevada proporción de bacterias proteolíticas y celulolíticas observada en los reactores. A diferencia del AnMBR mesófilo, el phylum Chloroflexi sólo representó el 1.1% de todas las secuencias, mientras que el phylum Firmicutes es uno de los predominantes en el CSTR termófilo. La distribución de estos phyla puede ser atribuida a la temperatura operacional del proceso y a la baja tolerancia que presenta Chloroflexi al amonio, el cual es dos veces superior en el CSTR termófilo que en el AnMBR mesófilo en este periodo (Figura 4.23b, Figura 4.17). Sin embargo, el papel funcional de Chloroflexi podría ser realizado por los phyla Firmicutes y EM3, ya que parecen exhibir una redundancia funcional (St-Pierre and Wright, 2014).

El phylum EM3 ha sido recientemente asignado (en base a un 98% de similitud del gen ARNr 16S) a un nuevo candidato metagenómico denominado “Pyropristinus” Tipo 1 y Tipo 2 por Colman et al. (2016). Estos autores sugirieron que EM3 son bacterias quimiorganoheterótrofas cuyo supuesto papel en fuentes termales es la degradación de polisacáridos y proteínas, tales como los encontrados en la estructura de las microalgas empeladas como sustrato en la presente tesis. Concluyeron que EM3 son probablemente organismos capaces de llevar a cabo la respiración aerobia y la fosforilación oxidativa en rangos de temperatura hipertermófilos. Sin embargo, estos autores detectaron que EM3 juegan un papel importante en el ciclo del carbono y que podrían respirar anaeróbicamente, lo cual ha sido confirmado con la elevada abundancia de este phylum en el CSTR termófilo, así como por su detección en

estudios de digestión anaerobia de biomasa lignocelulósica en condiciones termófilas (Oosterkamp et al., 2016).

El phylum Proteobacteria, el cual también está presente en el AnMBR mesófilo, está involucrado en la degradación de proteínas y celulosa así como en la degradación sintrófica de ácidos orgánicos. Así mismo, el género *Anaerobaculum*, perteneciente al phylum Synergistetes, también se encuentra involucrado en la degradación sintrófica de ácidos orgánicos, péptidos y carbohidratos, mientras que los miembros del phylum Thermotogae son capaces de oxidar sintróficamente el acetato (Frock and Kelly, 2012). Consecuentemente, la elevada concentración de AGV en el reactor (Figura 4.23c, Tabla 4.16) puede asociarse a la baja abundancia de estos phyla en el medio, mientras que la capacidad del proceso para degradar las microalgas puede verse asociado a la elevada actividad proteolítica de los microorganismos.

A pesar de que la biodiversidad estimada en este reactor fue menor que en el AnMBR mesófilo (Figura 4.31, Tabla 4.22), este reactor también contiene phyla con un elevado potencia hidrolítico. Mientras el género *Coprothermobacter* es comúnmente detectado en digestores termófilos, especialmente cuando la celulosa es empleada como sustrato, EM3 fue un phylum detectado en gran abundancia pero cuya función metabólica en digestores anaerobios permanece indefinida. Sin embargo, esta elevada abundancia relativa de EM3 (38.7%) en el reactor, sugiere que este phylum juega un papel importante en la biodegradación de las microalgas. Por ello, es necesario un futuro estudio a nivel de metagenómica y proteómica para poder definir su función en el proceso, lo cual proporcionaría una valiosa información para la optimización del mismo.

En cuanto al dominio Archaea, éste representó el 2.1% de todas la secuencias obtenidas en el CSTR termófilo (Tabla 4.21), siendo *Methanobacteriales* (67% de Archaea) el orden más abundante. El versátil metabolismo de las archaeas *Methanobacteriales* les permite llevar a cabo tanto la metanogénesis

hidrogenotrófica como la acetoclástica. Sin embargo, la elevada abundancia de microorganismos productores de hidrógeno y oxidadores sintróficos de acetato, sugiere que la ruta metabólica de producción de metano es la hidrogenotrófica, pese a que también están presentes metanógenos acetoclásticos estrictos como *Methanosaeta* (30.1%). La elevada concentración de amonio y amoniaco en el sistema influye sobre la presencia y actividad de los metanógenos, ya que estas condiciones favorecen el crecimiento de *Methanobacteriales* (Nolla-Ardèvol et al., 2015), sugiriendo que la ruta hidrogenotrófica para producir metano es la dominante.

4.4.4. Comunidad de Bacterias y Archaeas en la biomasa algal

Como ya se ha comentado previamente, el análisis de las comunidades de bacterias y archaeas presentes en el alimento se llevó a cabo con la finalidad de evaluar su influencia sobre las poblaciones microbianas de los reactores, ya que la biomasa algal no provenía de un cultivo puro. Este análisis reveló que solo el 0.27% de todas las secuencias fueron asignadas al dominio Archaea (Tabla 4.21), mientras que el dominio Bacteria estuvo compuesto por los phyla Proteobacteria (38.6%), Firmicutes (15.8%), Bacteroidetes (15.3%), Chloroflexi (5.4%), Spirochaetes (4.0%), Verrucomicrobia (3.7%) y Actinobacteria (2.6%) (Figura 4.29). Como puede verse en la Figura 4.29, el sustrato y los reactores comparten algunos phyla bacteriales aunque tanto sus abundancias relativas como los géneros detectados en los phyla compartidos fueron muy diferentes (Figura 4.30, Tabla 4.21). El análisis de la beta-diversidad (Figura 4.33a) y el test estadístico ANOSIM (Figura 4.34, Tabla 4.23), confirmaron que las comunidades microbianas de ambos reactores son muy distintas de las encontradas en el alimento. Estos resultados indican que la composición de la comunidad microbiana de ambos reactores fue una consecuencia de las condiciones operacionales establecidas, y no de la baja proporción de microorganismos procariotas presentes en el influente. Así mismo, en comparación con los estudios de otros autores detallados anteriormente, el uso de *Scenedesmus* spp. como alimento también influyó en la composición de la población microbiana

de los reactores, ya que origina el crecimiento de especies adaptadas a la biodegradación de este sustrato.

4.4.5. Conclusiones del análisis de las poblaciones microbianas

El análisis de la comunidad microbiana del AnMBR mesófilo se realizó durante el estado estacionario del periodo M-IV, donde alcanzó un 72.3% de eliminación de DQO. Este análisis reveló una amplia variedad de phyla entre los que se incluye Chloroflexi, WWE1 y Proteobacteria. Dado que estos phyla son conocidos por su elevada capacidad hidrolítica, su presencia puede relacionarse con la degradación de la biomasa algal, especialmente de la pared celular de las microalgas. Esta diversidad de phyla que contribuyen a la degradación de las microalgas, fue probablemente promovida por el elevado TRC establecido en el reactor mediante el uso de la configuración AnMBR, ya que permite retener microorganismos de lento crecimiento en el sistema. En cuanto al dominio Archaea, *Methanosaeta* fue el género dominante, probablemente debido a la temperatura de operación y las concentraciones de amonio en el reactor. Esto sugiere que la materia orgánica fue transformada a metano principalmente mediante la ruta metabólica acetoclástica.

El análisis de las comunidades microbianas en el reactor CSTR termófilo se llevó a cabo durante el estado estacionario del periodo T-V, en el cual se alcanzó un 32.6% de eliminación de DQO y una concentración de amonio dos veces superior a la alcanzada en el AnMBR mesófilo. Este análisis reveló que la biodiversidad en este reactor fue menor que en el AnMBR mesófilo, probablemente debido a la elevada temperatura operacional. Sin embargo, el CSTR termófilo estuvo compuesto por bacterias con una elevada capacidad proteolítica y celulolítica tales como Firmicutes y EM3. La elevada abundancia relativa de EM3 (38.7%) indica que este phylum podría estar involucrado en la degradación de los componentes de la biomasa algal, aunque su función metabólica no está definida todavía en digestores anaerobios. Por ello, es necesario un estudio más amplio sobre el metabolismo de este phylum con

el fin de obtener información que permita optimizar el proceso. La abundancia de bacterias sintróficas junto con metanógenos hidrogenotróficos y las elevadas concentraciones de amonio en el reactor, sugiere que el principal mecanismo de producción de metano fue el metabolismo hidrogenotrófico.

En conclusión, este estudio muestra que las microalgas *Scenedesmus* spp. pueden ser eficientemente transformadas en biogás a través de una digestión anaerobia a elevados TRC, empleando una configuración AnMBR, puesto que permite el desarrollo de una comunidad microbiana fuertemente hidrolítica. Así mismo, se demuestra que bajo condiciones termófilas también se desarrolla una biomasa con alta capacidad hidrolítica para degradar la biomasa algal. Así pues, la optimización del proceso podría alcanzarse mediante la modificación de las condiciones operacionales para favorecer el crecimiento de los microorganismos detectados, empleándolos como sensores del correcto funcionamiento del proceso.

Conclusiones

5. Conclusiones/Conclusions

Las conclusiones más relevantes que se pueden extraer del presente trabajo de tesis, en el que se ha estudiado la degradación anaerobia de las microalgas *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp. para maximizar su biometanización, se han agrupado en función de los cuatro bloques en los que se estructuró el plan de trabajo:

Pretratamiento enzimático

- La adaptación del inóculo al sustrato que se pretende degradar es un factor clave para maximizar la hidrólisis de sustratos difícilmente biodegradables, como las microalgas cultivadas en agua residual. Así pues, se demostró que un inóculo mesófilo adaptado a la degradación de microalgas es capaz de alcanzar una biodegradabilidad del 36.7%, frente al 22.3% que se obtiene con un inóculo mesófilo que no ha sido previamente adaptado.
- La combinación de un pH de 6.5, una temperatura de 60°C y una dosis del complejo enzimático Viscozyme® L de 0.1 mL·gST⁻¹ durante el pretratamiento enzimático, incrementa la biodegradabilidad anaerobia de las microalgas *Scenedesmus* spp. hasta el 65.7%.
- El incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal tras el pretratamiento enzimático es debido a la acción de las enzimas, combinadas con las adecuadas condiciones de temperatura y pH, y no al efecto individual del pretratamiento térmico. El pretratamiento térmico de la biomasa algal por sí solo, a un pH de 5.5, no evidenció un incremento significativo de la biometanización de las microalgas. Sin embargo, su combinación con una dosis de enzima (Viscozyme® L) de 0.3 mL·gST⁻¹, produjo un incremento de la biodegradabilidad de la biomasa algal de 36.7% a 51.7%.
- El porcentaje de materia orgánica solubilizada no se corresponde con el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado tras el

pretratamiento. Las distintas combinaciones de pH, dosis y temperatura dieron lugar a un valor de sólidos volátiles hidrolizados similar. Sin embargo, solo los pretratamientos enzimáticos realizados a 60°C resultaron en un incremento significativo de la biometanización de las microalgas.

Operación en continuo de un reactor anaerobio mesófilo de microalgas a elevados TRC

- Se ha demostrado que la actividad hidrolítica de la propia biomasa anaerobia puede ser incrementada a elevados TRC. De esta forma, se alcanzó una biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* spp. del 70.9% a 100 días de TRC y de las microalgas *Chlorella* spp. del 73.9% a un TRC de 140 días, siendo ambos resultados muy superiores a cualquiera de los reportados hasta el momento en la bibliografía.
- La biodegradabilidad de la biomasa algal no se incrementa significativamente operando el reactor a valores de TRC superiores a 100 días.
- El desarrollo de una comunidad microbiana adaptada a la degradación anaerobia de microalgas junto con la flexibilidad operacional que proporciona la configuración AnMBR, permite incrementar la biodegradabilidad de la biomasa algal del 42.3% al 50.1% tras el aumento de la OLR alimentada al reactor de 0.2 a 0.4 gDQO·d⁻¹·L⁻¹ sin que se produzca la acumulación de AGV en el sistema, es decir, sin que el proceso biológico experimente una sobrecarga o evidencie inhibición en el rango de OLR estudiado. El uso de membranas permite incrementar la OLR modificando conjuntamente el caudal de tratamiento y la concentración de microalgas en el alimento. Consecuentemente, el caudal puede incrementarse sin necesidad de aumentar el volumen de reacción y, a su vez, puede disminuirse la concentración de microalgas en el alimento sin

provocar el lavado de microorganismos, lo que reduce la concentración de posibles inhibidores como el nitrógeno amoniacal o los compuestos intermedios producidos durante la digestión anaerobia, además de reducir los costes asociados al proceso de concentración de microalgas.

- Se ha observado que tanto el tipo de microalga como las condiciones en las que se lleve a cabo su cultivo afectan a su biodegradabilidad anaerobia, ya que las microalgas *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp. alcanzaron distintos porcentajes de biodegradabilidad bajo las mismas condiciones de operación, 70.9% y 61.8% respectivamente. Por consiguiente, es necesario optimizar las condiciones operacionales de la digestión anaerobia para cada sustrato en concreto. Así mismo, el cultivo de microalgas en agua residual real y bajo condiciones de estrés dio lugar a que la biomasa algal dominada por *Chlorella* spp. presentara una menor biodegradabilidad que la constituida por *Scenedesmus* spp., en contra de lo que se esperaba en base a la bibliografía consultada.
- La operación del reactor a altos TRC y la elevada biometanización de la biomasa algal consigue reducir considerablemente la producción de fangos y, por tanto, los costes asociados a su tratamiento y disposición.
- La solubilización de nitrógeno en el reactor, debido a la hidrólisis de las microalgas por parte de los microorganismos, excede en todos los casos a la biodegradabilidad anaerobia alcanzada en cada periodo de estudio, como consecuencia de la baja relación C/N que presenta la biomasa algal en su composición.
- La baja concentración de fosfato detectada en el efluente, junto con la menor concentración de calcio a la salida del reactor respecto a la entrada, indicó que se estaba produciendo la precipitación incontrolada de fósforo en el interior del reactor.

- La alta calidad del efluente debido al elevado rendimiento del proceso y al uso de la tecnología de membrana de ultrafiltración, permite su reutilización para el cultivo de nueva biomasa algal. Así pues, el cultivo de microalgas en un FBR a escala de laboratorio y empleando este efluente como medio de cultivo, resultó en un incremento de la concentración de sólidos de la biomasa algal de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $1350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en 19 días. Consecuentemente, el crecimiento de las microalgas produjo una reducción significativa de las concentraciones de amonio y fosfato en el medio, dando lugar a un porcentaje de eliminación de NH_4 y PO_4 del 94.0% y del 98.7% respectivamente.
- Se ha demostrado que la incorporación de membranas al reactor anaerobio representa una prometedora tecnología para la digestión anaerobia de biomasa algal, dado que permite operar el reactor a elevados TRC y caudales de tratamiento, alcanzando un elevado rendimiento sin la aplicación de costosos pretratamientos y sin que se produzca una acumulación de sólidos tal, que afecte al proceso físico de filtración o implique el uso de grandes volúmenes de reacción.

Operación en continuo de un reactor anaerobio de microalgas a elevada temperatura (55°C)

- Se confirmó que los microorganismos termófilos tienen una mayor actividad hidrolítica que los microorganismos mesófilos dado que, bajo las mismas condiciones operacionales ($\text{TRC} = \text{TRH} = 50$ días y $\text{OLR} = 0.2 \text{ gDQO}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) y configuración de reactor (CSTR), se consiguió una biodegradabilidad de la biomasa algal del 31.7% a 55°C, mientras que a 35°C solo se alcanzó el 11.3%.
- La elevada hidrólisis de la biomasa algal a 55°C produce una mayor liberación de amonio al medio que, combinada con la elevada temperatura

operacional, da lugar a un incremento del amoníaco en el reactor mayor que el producido a 35°C, generando la inhibición parcial del proceso biológico y dando como resultado un reducido rendimiento de producción de metano.

- Los metanógenos acetoclásticos son capaces de adaptarse al incremento progresivo de amoníaco en el medio. Al inicio de la experimentación, una concentración de amoníaco de $19.69 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ dio lugar a una acumulación de AGV de $124.8 \text{ mgCH}_3\text{COOH} \cdot \text{L}^{-1}$. Sin embargo, tras la adaptación de la biomasa anaerobia a una elevada concentración de amoníaco, los organismos metanógenos fueron capaces de reducir los AGV hasta $79.7 \text{ mgCH}_3\text{COOH} \cdot \text{L}^{-1}$ en presencia de una concentración de amoníaco de $62.23 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. La adaptación de la biomasa anaerobia a la presencia de amoníaco produjo un incremento en el rendimiento de producción de metano de 110.9 a $146.7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{inf}}^{-1}$.
- La operación del CSTR termófilo a elevados TRCs incrementa la biodegradabilidad de las microalgas pero también la concentración de amonio, y por tanto de amoníaco, en el reactor dando lugar a un estado pseudo-estacionario inhibido. El incremento del TRC de 50 a 70 días manteniendo la OLR solo incrementó la biodegradabilidad del 41.1% al 46.8%, produciéndose una acumulación de AGV de $519.7 \text{ mgCH}_3\text{COOH} \cdot \text{L}^{-1}$.
- El CSTR termófilo no es capaz de operar con concentraciones de microalgas en el alimento que alcancen valores de DQO de $20000 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, sin que el proceso biológico sea inhibido por amoníaco, por lo que no solo el TRC y la OLR deben ser optimizados sino que la concentración de las microalgas en el influente también juega un papel clave en la optimización del proceso biológico.
- La mayor degradación anaerobia de las microalgas, como consecuencia de la elevada actividad hidrolítica de los microorganismos termófilos, dio lugar

a producciones de fango significativamente inferiores a la obtenida en el CSTR mesófilo.

- El porcentaje de nitrógeno solubilizado excede al porcentaje de microalgas biodegradadas como consecuencia de la baja relación de C/N de este sustrato. A pesar de que en el reactor termófilo se alcanzó una menor biometanización de las microalgas que en el AnMBR mesófilo, la solubilización de nitrógeno obtenida en el CSTR operado a 55°C llegó a ser superior en algunos periodos debido a la elevada concentración de microalgas en el influente.
- De la misma forma que en el reactor anaerobio mesófilo, la menor concentración de fosfato en el efluente con respecto a la entrada puso de manifiesto que en el CSTR termófilo también tuvo la precipitación incontrolada en el interior del reactor.
- Mediante el ensayo de inhibición en continuo y los ensayos de inhibición en *batch*, se determinó que el proceso empieza a inhibirse a partir de una concentración de amoníaco en el reactor de $70 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, y exhibe una inhibición del proceso del 89% cuando la concentración de amoníaco alcanza los $156.25 \text{ mgN-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, siendo necesario desarrollar alternativas que permitan llevar a cabo la digestión anaerobia termófila en ausencia de inhibición, como puede ser la co-digestión o la implementación de la tecnología de membranas.

Población microbiana involucrada en la degradación anaerobia de microalgas

- La baja proporción de microorganismos procariotas presente en el alimento, debido a que las microalgas empleadas como sustrato no provenían de un cultivo puro, no influyó sobre las comunidades microbianas desarrolladas en ambos reactores, sino que éstas fueron resultado de las condiciones ambientales existentes en cada uno de ellos y del tipo de sustrato a degradar.

- La operación del reactor mesófilo a 100 días de TRC potencia la actividad hidrolítica del proceso, puesto que se promovió el desarrollo de microorganismos con baja tasa de crecimiento. Se detectó una comunidad microbiana con una alta biodiversidad, compuesta mayoritariamente por Chloroflexi, WWE1 y Proteobacteria, los cuales presentan una elevada capacidad celulolítica y proteolítica.
- La elevada abundancia relativa de las archaeas *Methanosaeta* en el reactor mesófilo, denotó que la producción de metano bajo estas condiciones se produce principalmente por la vía acetoclástica.
- La comunidad microbiana del reactor termófilo, pese a tener una menor biodiversidad que el AnMBR mesófilo, también estaba constituida por microorganismos con una alta capacidad hidrolítica como los pertenecientes al phylum Firmicutes.
- La temperatura de operación y la concentración de amoníaco en el medio son dos de los factores que tienen mayor influencia sobre la distribución de los microorganismos en los reactores.
- El phylum EM3, cuya función metabólica en digestores anaerobios no está definida, abarcaba el 38.7% de abundancia relativa, lo que indica que se encuentra estrechamente relacionado con la degradación anaerobia de los componentes de la biomasa algal bajo condiciones termófilas.
- La elevada abundancia relativa de microorganismos sintróficos, tales como los pertenecientes a los phyla Synergistetes y Thermotogae, y de archaeas hidrogenotróficas como las pertenecientes al orden Methanobacteriales, indican que la producción de metano durante la digestión anaerobia de microalgas a 55°C se produce principalmente por la vía hidrogenotrófica.

Conclusions

The most relevant conclusions drawn from this thesis, which is focused on maximize the biomethanization of *Scenedesmus* spp. and *Chlorella* spp. microalgae via anaerobic digestion, have been clustered in four blocks as follows:

Enzymatic pretreatment

- Inoculum adaptation to the substrate is a key factor to maximize the hydrolysis rate of recalcitrant substrates such as microalgae grown in wastewater. A mesophilic inoculum adapted to degrade microalgae achieved a 36.7% of biodegradability, against the value of 22.3% achieved by a non-adapted mesophilic inoculum.
- An enzymatic pretreatment carried out at a pH of 6.5, temperature of 60°C and enzymatic complex (Viscozyme® L) dose of 0.1 mL·gTS⁻¹ gave rise to an increase of *Scenedesmus* spp. microalgal biodegradation up to 65.7%.
- The increase of microalgal biomass biodegradability after an enzymatic pretreatment was due to the action of the enzymes in combination with the appropriate conditions of temperature and pH. The thermic pretreatment at 50°C in combination with a pH of 5.5 did not result in a significant increase of microalgal biomethanization. However, these pH and temperature conditions with the addition an enzyme dose of 0.3 mL·gTS⁻¹ gave rise to a biodegradability increase from 36.7% to 51.7%.
- The percentage of organic matter solubilisation did not correspond to the microalgal biodegradability reached after pretreatment. Although all the experiments resulted in similar values of hydrolysed volatile solids, only the experiments conducted at 60°C resulted in a significant increase of microalgal biomethanization.

Microalgal biodegradation within a continuous mesophilic anaerobic reactor at high solid retention time (SRT)

- It has been demonstrated that the hydrolytic activity of anaerobic biomass can be increased operating the reactor at a high SRT. At a 100 days of SRT, *Scenedesmus* spp. microalgal biodegradability achieved a value of 70.9%, and at a SRT of 140 days the biodegradability of *Chlorella* spp. biomass reached 73.9%, thereby resulting in one of the highest biogas productions currently reported from the anaerobic digestion of raw microalgal biomass grown in wastewater.
- Operating the reactor at SRT higher than 100 days did not result in a significant increase of the microalgal biomass biodegradability.
- Developing a microbial community adapted to anaerobic degradation of microalgae along with the operational flexibility provided by the use of AnMBR configuration, allowed to increase microalgal biodegradability from 42.3% to 50.1% through OLR rise from 0.2 to 0.4 gCOD·d⁻¹·L⁻¹ with non-accumulated volatile fatty acids (VFA), meaning that neither overload nor inhibition occurred. Membrane technology makes it possible to operate at different OLR by modifying the treatment flow rate and microalgal concentration all at once. Consequently, the reactor can work at a high hydraulic retention time (HRT) and a low microalgal concentration in the influent with neither increasing the reactor volume required nor the washing-out the microbial population. Furthermore, the use of a low microalgal concentration as a substrate also reduces the concentration of possible inhibitors such as ammonia nitrogen or intermediate compounds produced as well as the costs of the microalgal harvesting.
- The type of microalgae and their grown conditions influenced the anaerobic biodegradation since *Scenedesmus* spp. and *Chlorella* spp. microalgae reached a different percentage of biodegradability under the same

operational conditions established, 70.9% and 61.8% respectively. Thus, the operational conditions of the anaerobic reactor have to be optimized for the chosen substrate. In contrast to the results reported in the literature, *Chlorella* spp. gave rise to a lower anaerobic biodegradation than *Scenedesmus* spp. microalgae due to their culture in a real wastewater and under stressed conditions. In these conditions, *Chlorella* spp. increased their resistance to bacterial degradation to a larger extend than to *Scenedesmus* spp. microalgae.

- The reactor operating at high SRT combined with the high value of microalgal biomethanization reached, led to a significant reduction in sludge production, contributing to cost reduction of treatment and disposal of sludge.
- Nitrogen solubilisation exceeded anaerobic biodegradation in all periods as a consequence of microalgal biomass composition, which exhibited a low C/N ratio.
- A low phosphate concentration in the effluent along with a significantly lower concentration of calcium in the effluent than in the influent, revealed that a non-controlled precipitation of phosphorus occurred within the reactor. This fact was confirmed once experimental study was finalized since a high amount of precipitate was found within the reactor.
- The high process performance and the use of membrane technology resulted in a high quality effluent that can be reused to new microalgal biomass culture. A microalgae cultured in a lab-scale FBR using this effluent as a growth medium was able to increase biomass solids concentration from 50 mg·L⁻¹ to 1350 mg·L⁻¹ in 19 days. Consequently, the ammonium and phosphate concentrations were significantly reduced, giving rise to a percentage of NH₄ and PO₄ removal of 94.0% and 98.7% respectively.

- It has been demonstrated that membrane incorporation to the anaerobic reactor is a suitable technology to anaerobically degrade microalgae since it allows working at a high SRT along with a high treatment flow rate, which gave rise to a high process performance without requiring costly pretreatments.

Microalgal biodegradation within a continuous thermophilic anaerobic reactor (55°C)

- Thermophilic microorganisms exhibited higher hydrolytic activity than mesophilic microorganisms: anaerobic biodegradability of microalgal biomass reached 31.7% at 55°C, while mesophilic anaerobic biodegradability only reached 11.3% at the same operational conditions (SRT = HRT = 50 days and OLR = 0.2 gCOD·d⁻¹·L⁻¹) and reactor configuration (CSTR).
- The high hydrolytic activity of thermophilic microorganisms releases a high amount of ammonia which in combination with the high operational temperature gave rise to a higher free ammonia concentration in the thermophilic reactor than in the anaerobic reactor at 35°C, which caused a partial inhibition of the biological process and thus reduced the methane production efficiency.
- Acetoclastic methanogens are able to adapt to a progressive increase of ammonia concentration in the process. At the beginning of the experimentation, a free ammonia concentration of 19.69 mgN-NH₃·L⁻¹ resulted in VFA accumulation of 124.8 mgCH₃COOH·L⁻¹. However, microbial adaptation to a high free ammonia concentration caused a reduction of VFA to 79.7 mgCH₃COOH·L⁻¹ in presence of a higher ammonia concentration (62.23 mgN-NH₃·L⁻¹). This adaptation phenomenon gave rise to a methane production increase from 110.9 to 146.7 mLCH₄·gCOD_{inf}⁻¹.

- Thermophilic CSTR at high SRT increases the microalgal biodegradability and consequently the ammonium concentration and the free ammonia level in the reactor, which can cause the microbial inhibition. For this reason, increasing the SRT from 50 to 70 days only resulted in a biological degradation rise from 41.1% to 46.8%, and caused a VFA accumulation of $519.7 \text{ mgCH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Microalgal COD values higher than $20000 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ in the influent resulted in a thermophilic CSTR inhibition. Therefore, not only SRT and OLR have to be optimized, but also microalgal concentration plays an important role in the biological process optimization.
- The high microalgae anaerobic biodegradation achieved at thermophilic conditions resulted in a significant lower sludge production in comparison with the mesophilic CSTR.
- The percentage of soluble nitrogen exceeded the percentage of microalgae biodegraded as a consequence of the low C/N ratio of substrate composition. However, although thermophilic reactor reached a lower microalgae biodegradation than the mesophilic reactor, it resulted in a higher nitrogen solubilisation than mesophilic reactor in some periods due to the high microalgal concentration in the influent.
- Phosphate concentration in the effluent was lower than in the influent which revealed that non-controlled process precipitation of phosphorus was occurring within the thermophilic reactor.
- Tests of inhibition confirmed that the process inhibition starts at $70 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ and achieves 89% of inhibition at free ammonia concentration of $156.25 \text{ mgN-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Consequently, operational strategies should be designed in order to carry out thermophilic anaerobic digestion of

microalgae in the absence of inhibition such as co-digestion with a low-nitrogen co-substrate or the use of membrane technology.

Microbial population involved in microalgal anaerobic degradation

- Microalgae used as a feedstock did not come from a pure culture and thus, microalgal biomass contained a low percentage of prokaryote microorganisms. However, the microbial communities present in both reactors were not influenced by the feedstock microbes. They are a result of the unique ambient and operational conditions present in each reactor.
- The mesophilic reactor operated at 100 days of SRT increased the hydrolytic activity of the process by promoting the retention of low growth-rate microorganisms. Consequently, microbial analysis detected a high biodiversity in the reactor, which was mainly composed of Chloroflexi, WWE1 and Proteobacteria phyla. These phyla exhibit high cellulolytic and proteolytic capabilities.
- *Methanosaeta* was the dominant archaeal genera in the mesophilic reactor which suggest that the organic matter was mainly transformed into methane by the acetoclastic pathway.
- Microbial community detected in the thermophilic reactor exhibited lower biodiversity than the mesophilic AnMBR. However, it was composed of microorganisms with high hydrolytic capabilities such as those belonging to Firmicutes phylum.
- Operational temperature and free ammonia concentration in the reactor are key factors that have a large impact on the microbial community distribution by determining which species can thrive.
- Although the functional role of EM3 phylum remains undefined in anaerobic digesters, the high relative abundance of EM3 (38.7%) in the thermophilic

CSTR suggests that this phylum plays an important role in the biodegradation of microalgae under thermophilic conditions.

- In the thermophilic anaerobic digestion of microalgae, the methane was mainly produced through the hydrogenotrophic pathway. The microbial analysis revealed a high relative abundance of syntrophic microorganisms, such as those belonging to Synergistetes and Thermotogae phyla, along with hydrogenotrophic archaea such as those constituting the Methanobacteriales order.

Desarrollos futuros

6. Desarrollos futuros

Los resultados obtenidos en la presente tesis dejan abiertas nuevas líneas de investigación, tales como las detalladas a continuación:

- Estudio experimental para minimizar la precipitación incontrolada de fósforo en el interior del reactor. Existen distintas estrategias que se podrían estudiar para este fin:
 - a) Alimentar microalgas más diluidas para reducir la liberación de fosfatos durante la digestión anaerobia.
 - b) Estudiar alternativas para reducir la concentración de calcio en el influente.
 - c) Recuperar el fósforo tras la fase acidogénica de la digestión anaerobia de microalgas. La digestión anaerobia puede llevarse a cabo en dos fases mediante dos reactores en serie, en los que se lleva a cabo la fase acidogénica y metanogénica respectivamente. La fase acidogénica tiene lugar a un pH en torno a 6, más bajo que el que se mantiene cuando el proceso se desarrolla en una sola fase, ya que los microorganismos metanógenos no soportan valores de pH tan bajos. La operación de este reactor a un menor pH, reduce la precipitación de fósforo en el reactor, pudiendo ser éste recuperado del efluente de la fase acidogénica antes de ser alimentado a la fase metanogénica.
- Estudio de la digestión anaerobia de microalgas en condiciones termófilas con el fin de reducir o eliminar la inhibición por amoníaco, siguiendo distintas estrategias como:
 - a) Emplear la configuración de reactor AnMBR. Dado que esta configuración permite desacoplar el TRC y el TRH, podría

alimentarse el reactor con una menor concentración de microalgas, reduciendo así la concentración de amonio en el reactor y, consecuentemente, la presencia de amoniaco.

- b) Realizar una co-digestión de las microalgas con un co-sustrato que tenga un bajo contenido en nitrógeno como el fango procedente de la decantación primaria de una EDAR, el fango procedente del tratamiento anaerobio de agua residual urbana o la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.
- Desarrollo de una metodología que emplee los microorganismos que maximizan la biometanización de las microalgas como sensores del correcto funcionamiento del proceso biológico, con el fin de poder monitorizarlo y anticipar los posibles fallos.
- Análisis metagenómico y proteómico del CSTR termófilo, lo cual permitiría definir el metabolismo del phylum EM3 detectado mediante el análisis genómico, y conocer su implicación en la degradación anaerobia termófila de microalgas.

Anexo

7. Anexo

7.1. Nomenclatura

A ₂ O	Proceso Anaerobio-Anóxico-Óxico
AAR	Advanced flow-through Anaerobic Reactor
ADMCF	Advanced flow-through anaerobicDigester with an internal loop Microbial Cell Fuel
ADN	Ácido DesoxirriboNucléico
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
ALK	Alcalinidad
ALK _I	Alcalinidad intermedia
ALK _T	Alcalinidad total
AMPTS	Automatic Methane Potential Test System
AnMBR	Anaerobic Membrane BioReactor
AR	Agua Residual
ARU	Aguas Residual Urbana
ARN	Ácido RiboNucléico
ASBR	Anaerobic Sequencing Batch Reactor
ATP	Adenosin trifosfato
AVR	Accumulating-Volume Reactor
BMP	Biochemical Methane Potential
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
DQO	Demanda Química de Oxígeno

DQO _{inf}	Demanda Química de Oxígeno influente
DQOs	Demanda Química de Oxígeno Soluble
DQO _T	Demanda Química de Oxígeno Total
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EMP	Ruta de Embden-Meyhof-Parnas
FBGU	Fungal Beta-Glucanase Units
FBR	FotoBioReactor
FORSU	Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos
FPI	Formación de Personal Investigador
LCFA	Long Chain Fatty Acids
LD	Límite de Detección
MPBR	Membrane PhotoBioReactor
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
N	Nitrógeno
NGS	Next-Generation Sequencing
N _s	Nitrógeno soluble
N _T	Nitrógeno total
OLR	Organic Loading rate
OTU	Operational Taxonomic Units
P	Fósforo
PCA	Principal Components Analysis
PCoA	Principal Coordinate Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PF	Ruta de Pentosa Fosfato

P _T	Fósforo total
PTM	Presión TransMembrana
RSM	Response Surface Methodology
SAO	Syntrophic Acetate Oxidizing bacteria
SBR	Sequencing Batch Reactor
SMA	Specific Methanogenics Activity
SRA	Sequencing Read Archive
SRB	Sulfate-Reducing Bacteria
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles
TAN	Total Ammonia Nitrogen
TRC	Tiempo de Retención Celular
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
USSB	Upflow Static Sludge Bed
WD	Ruta de Warburg-Dickens
WRRF	Water Resource Recovery Facility
WWTP	WasteWater Treatment Plant

7.2.Métodos analíticos

7.2.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se define como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar completamente la materia orgánica y los compuestos oxidables de una determinada muestra. La determinación de la DQO total se ha llevado a cabo según el método 5220-B y la DQO soluble según el método 5220-C (APHA, 2012).

- 5220-B. Análisis de la DQO por el método de reflujo abierto

Este método, el cual es adecuado para muestras heterogéneas, se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una digestión ácida en presencia de dicromato. El procedimiento de análisis consiste en digerir un volumen de muestra conocido a 150°C durante 2 horas, bajo condiciones de reflujo total, en presencia de H_2SO_4 al 96% de pureza y un exceso conocido de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Esta reacción es catalizada mediante la adición de Ag_2SO_4 y las posibles interferencias por haluros se eliminan con la adición de HgSO_4 . Una vez finalizada la digestión ácida, el exceso de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se mide mediante una valoración potenciométrica redox, con un valorador automático (702 SM Titrino, Metrohm), empleando Sal de Mohr como valorante. Es necesario incluir un blanco, siguiendo el mismo procedimiento de las muestras pero usando agua destilada, para valorar la sal de Mohr y considerar las posibles interferencias de los reactivos usados.

- 5220-C. Análisis de la DQO por el método colorimétrico

Este método, el cual es adecuado para muestras homogéneas debido al menor volumen de muestra empleado, se basa en la medición de la absorbancia de las especies Cr^{3+} y Cr^{6+} a diferentes longitudes de onda. Durante la digestión ácida, el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ oxida la materia presente en la muestra, reduciéndose de Cr^{6+} a Cr^{3+} . Puesto que ambas especies muestran coloración, el Cr^{3+} es medido a una longitud de onda de 600 nm mientras que el Cr^{6+} se mide a 420 nm. En este caso, puesto que las

muestras se mantuvieron entre 0 y 125 mgDQO·L⁻¹ con la adecuada dilución, la longitud de onda empleada para la medición de la absorbancia fue de 446 nm, llevándose a cabo su determinación mediante espectrofotometría (Spectroquant® Pharo 300, Merk.). La obtención de la concentración de DQO se obtiene mediante una recta de calibrado previamente realizada.

7.2.2. Sólidos

La determinación de los sólidos se realizó siguiendo los métodos 2540-B, 2540-D y 2540-E (APHA, 2012).

- Sólidos totales (ST)

La determinación de los sólidos totales se realizó mediante el método 2540-B (APHA, 2012). Este método consiste en añadir un volumen de muestra determinado sobre una cápsula de peso conocido, e introducirlo en un horno a 105°C (3-4 horas) para evaporar el agua presente en la muestra. Una vez evaporada el agua, la cápsula con el residuo seco se enfría en un desecador para evitar que la humedad ambiental altere la medida, calculándose los sólidos totales como:

$$ST \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Residuo seco}_{\text{peso tras horno (mg)}} - \text{Cápsula}_{\text{peso sin muestra (mg)}}}{\text{Volumen de muestra añadido (L)}} \quad [\text{Ec. 6.1}]$$

donde Residuo seco_{peso tras horno} (mg) se corresponde con el peso de la cápsula junto con el peso de la muestra tras la evaporación del agua a 105°C.

- Sólidos suspendidos totales (SST)

La determinación de los sólidos suspendidos totales se realiza mediante el método 2540-D (APHA, 2012), el cual consiste en filtrar un volumen de muestra conocido a través de un filtro de 0.45 µm, previamente pesado junto con la cápsula. El resto del procedimiento de evaporación del agua y cálculo (Ec. 6.1) es el mismo que se aplica para los sólidos totales.

- **Sólidos volátiles (SV) y sólidos suspendidos volátiles (SSV)**

El procedimiento a seguir para la determinación de la fracción volátil de los sólidos totales y los sólidos suspendidos es el mismo, 2540-E (APHA, 2012). El residuo seco obtenido tras la evaporación del agua a 105°C, es introducido en una mufla a 550°C de temperatura con el fin de calcinar la muestra y eliminar así toda fracción volátil presente. Una vez calcinada la muestra, ésta se termina de enfriar en un desecador para reducir la posible interferencia de la humedad ambiental, calculándose la fracción volátil mediante la siguiente ecuación:

$$\text{SV o SSV (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Residuo seco}_{\text{peso tras horno (mg)}} - \text{Residuo calcinado}_{\text{peso tras mufla (mg)}}}{\text{Volumen de muestra (L)}} \quad [\text{Ec. 6.2}]$$

donde Residuo seco_{peso tras horno (mg)} se corresponde con el peso de la cápsula junto con el peso de la muestra tras la evaporación del agua a 105°C, en el caso de los SV, y peso de la cápsulas junto con el filtro y el peso de la muestra tras la evaporación del agua a 105°C, en el caso de los SSV. Cabe destacar que para la determinación de los SSV, debe emplearse un filtro que no deje cenizas tras la calcinación.

7.2.3. Compuestos nitrogenados

- **Nitrógeno total (N_T) y nitrógeno soluble (N_s)**

El nitrógeno total engloba a todas las fracciones del nitrógeno, tanto solubles como particulada, mientras que el nitrógeno soluble solo comprende aquellas fracciones del nitrógeno que son capaces de atravesar un filtro de 0.45 µm. La metodología utilizada se basa en el método DIN EN ISO 11905-1. El método consiste en transformar todos los compuestos nitrogenados de la muestra en nitrato mediante una digestión alcalina con NaOH, durante 60 minutos a 120°C, en presencia de peroxidisulfato de dipotasio que actúa como agente oxidante. La disolución de nitritos resultante se hace reaccionar con ácido benzoico en un medio ácido (H₂SO₄), lo cual proporciona un color rojizo a la muestra equivalente a la concentración de

nitratos y que permite su medición mediante espectrofotometría (Spectroquant® Pharo 300, Merk. Método 14537).

- **Amonio**

El amonio es una forma soluble de nitrógeno por lo que, para su determinación, la muestra debe ser previamente filtrada a través de un filtro de 0.45 µm. La determinación de amonio en la muestra se lleva a cabo mediante el método 4500-NH₃-G (APHA, 2012), el cual consiste en hacer reaccionar la fracción soluble de la muestra con hipoclorito, una solución alcalina de fenol y empleando nitroprusiato de sodio como catalizador. Esta reacción da lugar a la formación de un compuesto azul, indofenol, cuya intensidad dependerá de la concentración de amonio en la muestra. Una vez completada la reacción, la concentración de amonio se mide por espectrofotometría haciendo uso de un analizador automático multiparamétrico (Smartchem 200 automatic analyzer. Westco Scientific Instruments, Inc.).

7.2.4. Compuestos de fósforo

- **Fósforo total (P_T)**

La determinación de la concentración de fósforo total requiere la conversión previa de todo el fósforo presente a ortofosfatos, proceso que se lleva a cabo mediante el método 4500-P-B (APHA, 2012). Este método consiste en la oxidación de las distintas formas de fósforo presentes en la muestra mediante una digestión ácida con persulfato potásico y ácido sulfúrico, con un tiempo de reacción de 2 h y una temperatura de 150 °C. Tras el proceso de digestión, la concentración de los ortofosfatos liberados se determinó aplicando el método 4500-P-F (APHA, 2012). Este método consiste en la determinación del ion fosfato por la reacción del molibdato amónico, tartrato de amonio y potasio, que forman un complejo de antimonio-fosfomolibdato en medio ácido, el cual se reduce con ácido ascórbico para dar lugar a una coloración azul, cuya intensidad dependerá de la concentración de ortofosfatos en la muestra. Finalmente, la concentración de ortofosfatos, y por tanto

de fósforo total, determina mediante espectrofotometría con un analizador automático multiparamétrico (Smartchem 200 automatic analyzer. Westco Scientific Instruments, Inc.).

- **Ortofosfato**

El ortofosfato engloba las especies disueltas H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , en función del pH del medio. Dado que los ortofosfatos son compuestos solubles, para su determinación, la muestra debe ser previamente filtrada a través de un filtro de 0.45 μm . La concentración de ortofosfatos en la muestra se determina mediante el método metodología utilizada se realizó de acuerdo con el método 4500-P-F (APHA, 2012), explicado anteriormente para la determinación del fósforo total.

7.2.5. Sulfato

El sulfato es un compuesto soluble del azufre y, por tanto, su determinación requiere del previo filtrado de la muestra por un filtro de 0.45 μm . La concentración de sulfatos en la muestra se determina mediante el método 4500-SO₄²⁻-F (APHA, 2012), el cual consiste en hacer reaccionar la fracción soluble de la muestra con cloruro de bario, a bajo pH, dando lugar así a la formación de sulfato de bario. El exceso de bario se hace reaccionar con azul de metiltimol a un alto pH, dando lugar a la formación de un quelado de color azul. El exceso de azul de metiltimol que no ha reaccionado tiene una coloración azul grisácea que indica la concentración de sulfatos en la muestra. Así pues, la concentración de sulfatos se determina mediante espectrofotometría con un analizador automático multiparamétrico (Smartchem 200 automatic analyzer. Westco Scientific Instruments, Inc.).

7.2.6. Ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) y alcalinidad (ALK)

La determinación de los ácidos grasos volátiles de cadena corta y de la alcalinidad se realizó mediante el método de valoración ácido-base propuesto por Moosbrugger

et al. (1992). Este método consiste en valorar la muestra con HCl 0.1 N, registrando el volumen consumido de este ácido para alcanzar cinco puntos de pH: 6.7, 5.9, 5.75, 5.2 y 4.3, mediante un valorador automático (716 DMS, Titrino de Metrohm). Una vez conocidos los distintos volúmenes de ácido, la concentración de ácidos grasos volátiles y de alcalinidad se obtiene mediante cálculos de equilibrio químico. Este método permite definir tres parámetros de medida de la alcalinidad: alcalinidad total (ALK_T) medida al punto de pH 4.3; alcalinidad parcial (ALK_P), asociada a la alcalinidad del carbonato y medida al punto de pH 5.75 y alcalinidad intermedia (ALK_I), asociada a la concentración de ácidos grasos volátiles. El software del valorador automático calcula la concentración de ácidos grasos volátiles (medidos como $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acético), y a partir de ellos la ALK_I , y la alcalinidad del carbonato (medida como $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbonato cálcico), es decir, la ALK_P . A partir de estos valores, se calcula la ALK_T en función de la concentración del resto de especies que contribuyen en el equilibrio ácido-base como son el fosfato, el amonio y el sulfuro).

7.3. Relación de tablas

Tabla 1.1. Ventajas e inconvenientes del tratamiento anaerobio de materia orgánica en comparación con el tratamiento aerobio (Adaptado de Seghezzo, 2004).

Tabla 1.2. Reacciones típicas en la degradación de la materia orgánica a CH_4 y CO_2 (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Tabla 1.3. Estrategias para mantener elevadas concentraciones de microorganismos en un proceso anaerobio (Adaptado de Khanal et al., 2017).

Tabla 1.4. Comparación del tratamiento aerobio y anaerobio convencional con la tecnología AnMBR (Adaptado de Lin et al., 2013).

Tabla 1.5. Producción de metano mediante la digestión anaerobia de distintas especies de microalgas.

Tabla 1.6. Composición media de las microalgas predominantes en agua residual (Adaptado de Klassen et al., 2016).

Tabla 3.1. Diseño factorial con los valores codificados y los valores reales de los factores variados en el pretratamiento enzimático.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales de los ensayos empleados para evaluar el efecto de la temperatura y la variación del pH sobre las condiciones reportadas por Mahdy et al. (2014).

Tabla 3.3. Condiciones operacionales establecidas en el reactor mesófilo para las dos configuraciones estudiadas.

Tabla 3.4. Condiciones operacionales establecidas en cada periodo experimental estudiado en el reactor CSTR termófilo.

Tabla 3.5. Concentraciones de las distintas soluciones empleadas para la preparación del medio de cultivo.

Tabla 3.6. Incremento de NH₄ en los distintos experimentos de inhibición de la actividad metanogénica.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales y resultados promedio obtenidos de los ensayos de pretratamiento de *Scenedesmus* spp. a 50°C durante 5 horas.

Tabla 4.2. Condiciones experimentales de los pretratamientos, sólidos volátiles de la biomasa algal sin pretratar (Algas frescas) y SV tras el pretratamiento junto con su correspondiente porcentaje de sólidos hidrolizados.

Tabla 4.3. Condiciones experimentales de los pretratamientos, producción de metano resultante de la digestión anaerobia en batch de microalgas *Scenedesmus* spp. pretratadas enzimáticamente y biodegradabilidad alcanzada de la biomasa algal en cada ensayo.

Tabla 4.4. Análisis estadístico de los tres factores evaluados con respecto a la variable respuesta, BMP (mLCH₄·gDQOalgas⁻¹).

Tabla 4.5. Caracterización de la biomasa algal alimentada en cada periodo de estudio del reactor mesófilo. Cada parámetro analizado se presenta como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.6. Relación molar media y porcentaje de nitrógeno y fósforo con respecto a la materia orgánica particulada presente en las microalgas en cada periodo experimental.

Tabla 4.7. Porcentaje de error en el balance de materia y porcentaje de DQO acumulada con respecto a la DQO alimentada en cada uno de los periodos experimentales estudiados.

Tabla 4.8. Resumen bibliográfico de la biodegradabilidad de las microalgas *Scenedesmus* en CSTRs mesófilos operados a distintos valores de TRC.

Tabla 4.9. Rendimiento del proceso anaerobio en términos de producción de biogás y metano, eliminación de DQO y biometanización en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresados como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.10. Sólidos totales y volátiles, producción de fango y sólidos eliminados en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios del reactor mesófilo, expresados como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.11. Caracterización del efluente del reactor mesófilo en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresados como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.12. Caracterización de la biomasa algal alimentada al reactor termófilo en los periodos en los que se alcanzó el estado pseudo-estacionario. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.13. Caracterización de la biomasa algal en cada OLR alimentada al reactor termófilo en el periodo T-VI, presentada como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.14. Relación molar media de nitrógeno y fósforo con respecto a la materia orgánica, presente en la fracción particulada de las microalgas alimentadas al CSTR termófilo. Porcentaje medio que representan estos nutrientes de los sólidos suspendidos de la biomasa algal.

Tabla 4.15. Porcentaje de error en el balance de materia y de la DQO acumulada en cada periodo del CSTR termófilo en el que se alcanzó el estado pseudo-estacionario.

Tabla 4.16. Resumen de los parámetros que caracterizan el rendimiento de la digestión anaerobia termófila y de los más influyentes en el proceso, presentados como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.17. Sólidos totales y volátiles, producción de fango y eliminación de SV en cada periodo pseudo-estacionario alcanzado en el reactor termófilo, expresados como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.18. Caracterización del efluente del reactor termófilo en cada uno de los periodos pseudo-estacionarios, expresada como media \pm desviación estándar.

Tabla 4.19. Amonio añadido, concentración de amoniaco inicial (control) y alcanzada y actividad metanogénica del fango procedente del CSTR termófilo en cada uno de los ensayos realizados, en términos de media \pm desviación estándar.

Tabla 4.20. Porcentaje de la SMA máxima e inhibición alcanzados en función de la concentración de amoníaco para cada uno de los periodos pseudo-estacionarios estudiados.

Tabla 4.21. Géneros de bacterias y archaeas más abundantes en el AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y las microalgas.

Tabla 4.22. Media \pm error estándar de los índices de diversidad obtenidos del reactor AnMBR mesófilo y el CSTR termófilo, ambos alimentados con *Scenedesmus*. spp.

Tabla 4.23. Matriz de valores del estadístico R obtenida del test ANOSIM.

7.4. Relación de figuras

Figura 1.1. Esquema general de un tratamiento de fangos activados.

Figura 1.2. Esquema de las etapas de la degradación anaerobia de materia orgánica. Los procesos involucrados en cada etapa han sido enumerados 1-7 (Adaptado de Batstone et al., 2002).

Figura 1.3. Esquema de la ruta de Embden-Meyhof-Parnas para la fermentación de azúcares (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.4. Posibles rutas metabólicas del piruvato (Ácido pirúvico) (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.5. Esquema de la ruta metabólica denominada β -oxidación (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.6. Esquema de la ruta metabólica de la producción hidrogenotrófica de metano (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.7. Producción de metano y CO₂ vía metanogénesis acetoclástica (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.8. Relación entre la velocidad de crecimiento de los microorganismos y la temperatura (Adaptado de Madigan et al., 2009).

Figura 1.9. Configuraciones de un AnMBR: (a) membrana interna sumergida, (b) membrana externa sumergida (c) membrana externa de flujo tangencial (Adaptado de Chang, 2014).

Figura 1.10. Procesos de conversión energética de la biomasa (Adaptado de Lee and Day, 2013; Qureshi et al., 2013).

Figura 1.11. Esquema de los pretratamientos utilizados para lograr la disrupción celular de la biomasa algal (Adaptado de Passos et al., 2014b).

Figura 3.1. Vista general de la planta AnMBR a escala de demostración.

Figura 3.2. Vista general de la planta piloto MPBR.

Figura 3.3. Esquema (a) y vista general (b) del sistema de membrana externa de flujo tangencial para concentrar la biomasa algal.

Figura 3.4. Distribución espacial del diseño factorial completo en el que se estudian 3 factores a 2 niveles.

Figura 3.5. Vista general (a) y esquema (b) del reactor CSTR en condiciones mesófilas.

Figura 3.6. Esquema (a) y vista general (b) del reactor mesófilo AnMBR.

Figura 3.7. Vista general (a) y esquema (b) del reactor CSTR en condiciones termófilas.

Figura 3.8. Ejemplo del cálculo de la tasa máxima de producción de metano en un ensayo de SMA.

Figura 4.1. Volumen de metano producido por gramo de DQO de microalgas para los distintos inóculos estudiados. El valor sobre cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

Figura 4.2. Producción de metano media por gramo de microalgas *Scenedesmus* spp. pretratadas. El valor junto a cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

Figura 4.3. Sólidos volátiles de las microalgas frescas (sin pretratar) y tras los ensayos de pretratamiento, así como el porcentaje SV hidrolizados alcanzado en cada ensayo.

Figura 4.4. Producción media de metano resultante de la degradación anaerobia en batch de las microalgas pretratadas enzimáticamente a (a) 40°C y (b) 60°C. El valor junto a cada curva indica el porcentaje de biodegradabilidad de la biomasa algal alcanzado.

Figura 4.5. Producción de metano obtenido de los distintos pretratamientos enzimáticos frente al ensayo que se ha tomado como punto central del diseño de experimentos (E4).

Figura 4.6. Evaluación del efecto simple de (a) la dosis de enzima, (b) el pH y (c) la temperatura sobre la BMP de las microalgas pretratadas enzimáticamente.

Figura 4.7. Ajuste de los valores de BMP obtenidos experimentalmente del pretratamiento enzimático y los estimados por el modelo, junto con las bandas de confianza (líneas rojas).

Figura 4.8. Contorno de la superficie de respuesta estimada del modelo de regresión obtenido, para la variación de la dosis y el pH a 40°C (a) y 60°C (c) y sus correspondientes representaciones de la superficie de respuesta (b) y (d).

Figura 4.9. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles en el reactor mesófilo junto con los estados pseudo-estacionarios detectados en la experimentación.

Figura 4.10. Balance de DQO en cada periodo experimental en términos de carga de DQO influente y distribución de la carga de DQO efluente.

Figura 4.11. Evolución de la producción de biogás y porcentaje de metano en el mismo (a) y rendimiento de producción de metano y eliminación de DQO (b) durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Figura 4.12. Evolución de los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Figura 4.13. Imagen de las microalgas *Scenedesmus* spp. (a) y *Chlorella* spp. (b), cultivadas en la planta MPBR. La barra representa 20 μm .

Figura 4.14. Evolución del rendimiento del proceso, en términos de eliminación de DQO, a medida que se incrementa el TRC, para cada periodo experimental estudiado.

Figura 4.15. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles (a), y eliminación de SV y producción de fango (b) durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Figura 4.16. Evolución de la presión transmembrana (PTM) durante la operación del reactor mesófilo AnMBR. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Figura 4.17. Evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato durante la operación del reactor mesófilo. La línea discontinua representa la incorporación de la membrana de ultrafiltración a la configuración del reactor.

Figura 4.18. Imágenes del precipitado extraído del interior del reactor mesófilo (a) y detalle ampliado del mismo (b), una vez terminada la experimentación.

Figura 4.19. Esquema (a) y vista general (b) del fotobiorreactor para el cultivo de microalgas en el permeado del reactor AnMBR.

Figura 4.20. Evolución de los SST y amonio (a) y del fosfato (b) en el FBR a escala de laboratorio alimentado con el permeado del AnMBR mesófilo.

Figura 4.21. Evolución de los sólidos totales, volátiles y del porcentaje de sólidos volátiles en el reactor CSTR termófilo. Las zonas sombreadas representan los estados pseudo-estacionarios identificados en cada periodo experimental.

Figura 4.22. Balance de materia orgánica en términos de DQO, realizado en el reactor CSTR termófilo para los estados pseudo-estacionarios identificados dentro de cada periodo experimental.

Figura 4.23. Evolución de la producción de biogás y el porcentaje de metano en el mismo (a), de la concentración de amonio y amoníaco (b) y de los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad (c) durante la operación del reactor termófilo.

Figura 4.24. Rendimiento del reactor CSTR termófilo en los cinco periodos pseudo-estacionarios identificados, en términos de eliminación de DQO y metano producido por gramo de DQO alimentada.

Figura 4.25. Evolución de los sólidos totales, sólidos volátiles y porcentaje de sólidos volátiles (a), y eliminación de SV y producción de fango (b) durante la operación del reactor termófilo.

Figura 4.26. Evolución de la concentración de amonio, amoníaco y fosfato durante la operación del reactor termófilo.

Figura 4.27. Actividad metanogénica del fango procedente del CSTR termófilo en función de la concentración de amoníaco (a) y su relación con la biometanización del acetato alcanzada tras 20 días (b) en cada ensayo.

Figura 4.28. Ajuste de la concentración de amoníaco y su correspondiente actividad metanogénica normalizada con respecto a la SMA máxima a una función de inhibición de tipo Hill.

Figura 4.29. Abundancia relativa de bacterias y archaeas a nivel de phylum. Los grupos taxonómicos con una abundancia relativa inferior al 1% han sido excluidos de la leyenda.

Figura 4.30. Abundancia relativa de bacterias y archaeas a nivel de género. Los grupos taxonómicos con una abundancia relativa inferior al 1% han sido excluidos de la leyenda.

Figura 4.31. Riqueza de la comunidad microbiana presente en ambos reactores y en la biomasa algal alimentada, expresada como el número de OTU0.97 observadas, tras el análisis de la secuenciación del gen 16S. Las barras representan el error estándar (SE) calculado para cada grupo de muestras, microalgas, AnMBR mesófilo y CSTR termófilo.

Figura 4.32. Porcentaje de microorganismos que comparten las muestras analizadas (AnMBR mesófilo, CSTR termófilo y la biomasa algal) con respecto a los identificados en la biomasa algal, representada mediante un diagrama de Venn.

Figura 4.33. Análisis de la matriz de distancias de las comunidades microbianas mediante PCoA (a) y análisis de los parámetros del proceso, listados como vectores (rojo), mediante PCA (b) para el reactor AnMBR mesofílico, el CSTR termofílico y las microalgas empleadas como sustrato.

Figura 4.34. Análisis estadístico de similaridad (ANOSIM), realizado a partir de la matriz de distancia euclídea, que representa la distancia entre grupos e inter-grupos de las muestras del AnMBR mesófilo, el CSTR termófilo y las microalgas.

Bibliografía

Bibliografía

- Adegbidi, H.G., Briggs, R.D., 2003. Nitrogen mineralization of sewage sludge and composted poultry manure applied to willow in a greenhouse experiment. *Biomass and Bioenergy* 25, 665–673. doi:10.1016/S0961-9534(03)00056-4
- Ahring, B.K., Ibrahim, A.A., Mladenovska, Z., 2001. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Res.* 35, 2446–2452. doi:10.1016/S0043-1354(00)00526-1
- Åkerström, A.M., Mortensen, L.M., Rusten, B., Gislerød, H.R., 2014. Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration. *J. Environ. Manage.* 144, 118–124. doi:10.1016/j.jenvman.2014.05.015
- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.113
- Anderson, M.J., 2008. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.tb00081.x
- Angenent, L.T., Sung, S., Raskin, L., 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36, 4648–4654. doi:10.1016/S0043-1354(02)00199-9
- APHA, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. ISBN: 978-0875532356

- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781. doi:10.1016/j.pecs.2008.06.002
- Aramrueang, N., Rapport, J., Zhang, R., 2016. Effects of hydraulic retention time and organic loading rate on performance and stability of anaerobic digestion of *Spirulina plantesis*. *Biosyst. Eng.* 147, 174–182. doi:10.1016/j.biosystemseng.2016.04.006
- Ariesyady, H.D., Ito, T., Okabe, S., 2007. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* 41, 1554–1568. doi:10.1016/j.watres.2006.12.036
- Aydin, S., 2016. Enhancement of microbial diversity and methane yield by bacterial bioaugmentation through the anaerobic digestion of *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5631–5637. doi:10.1007/s00253-016-7501-0
- Azizi, A., Kim, W., Lee, J.H., 2016. Comparison of microbial communities during the anaerobic digestion of *Gracilaria* under mesophilic and thermophilic conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–17. doi:10.1007/s11274-016-2112-6
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H., Vavilin, V., 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1. *Water Sci. Technol.* 1.
- Belmonte, M., Hsieh, C.-F., Figueroa, C., Campos, J.L., Vidal, G., 2011. Effect of free ammonia nitrogen on the methanogenic activity of swine wastewater. *Electron. J. Biotechnol.* 14, 1–11. doi:10.2225/vol14-issue3-fulltext-11

- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106. doi:10.1016/j.watres.2015.03.018
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., Praveen Kumar, R., Palani, S., 2015. Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 635–653. doi:10.1016/j.rser.2015.03.047
- Biller, P., Ross, A.B., 2014. Pyrolysis GC-MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. *Algal Res.* 6, 91–97. doi:10.1016/j.algal.2014.09.009
- Bohutskyi, P., Betenbaugh, M.J., Bouwer, E.J., 2014. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresour. Technol.* 155, 366–372. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.095
- Buendía, I.M., Fernández, F.J., Villaseñor, J., Rodríguez, L., 2009. Feasibility of anaerobic co-digestion as a treatment option of meat industry wastes. *Bioresour. Technol.* 100, 1903–1909. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.013
- Cabezas, A., de Araujo, J.C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., Sousa, D.Z., Trably, E., Etchebehere, C., 2015. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 555–593. doi:10.1007/s11157-015-9380-8
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19, 360–369. doi:10.1016/j.rser.2012.11.030
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley,

- G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Caporgno, M.P., Taleb, a., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., Bengoa, C., 2015a. Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Res.* 10, 232–239. doi:10.1016/j.algal.2015.05.011
- Caporgno, M.P., Trobajo, R., Caiola, N., Ibáñez, C., Fabregat, A., Bengoa, C., 2015b. Biogas production from sewage sludge and microalgae co-digestion under mesophilic and thermophilic conditions. *Renew. Energy* 75, 374–380. doi:10.1016/j.renene.2014.10.019
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J.M., 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 103–111. doi:10.1016/j.copbio.2015.01.008
- Carneiro, M.L.N.M., Pradelle, F., Braga, S.L., Gomes, M.S.P., Martins, A.R.F.A., Turkovics, F., Pradelle, R.N.C., 2017. Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). *Renew. Sustain. Energy Rev.* 73, 632–653. doi:10.1016/j.rser.2017.01.152
- Chang, S., 2014. Anaerobic Membrane Bioreactors (AnMBR) for Wastewater Treatment. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 04, 56–61. doi:10.4236/aces.2014.41008
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057

- Chng, L.M., Lee, K.T., Chan, D.J.C., 2016. Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Convers. Manag.* doi:10.1016/j.enconman.2016.10.026
- Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., Lee, T., 2013. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour. Technol.* 143, 330–336. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.017
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd ed, PRIMER-E, Plymouth UK.
- Colman, D.R., Jay, Z.J., Inskeep, W.P., Jennings, R.D.M., Maas, K.R., Rusch, D.B., Takacs-Vesbach, C.D., 2016. Novel, deep-branching heterotrophic bacterial populations recovered from thermal spring metagenomes. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00304
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., Conrad, R., 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the electron acceptor. *Arch Microbiol* 149, 350–357.
- Dai, X., Yan, H., Li, N., He, J., Ding, Y., Dai, L., Dong, B., 2016. Metabolic adaptation of microbial communities to ammonium stress in a high solid anaerobic digester with dewatered sludge. *Sci. Rep.* 6, 28193. doi:10.1038/srep28193
- De Lemos, C.A., 2007. Biological Wastewater Treatment: Anaerobic Reactors, Biological wastewater treatment in warm climate regions. ISBN: 9781843391647
- De Vrieze, J., Gildemyn, S., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D.H., Verstraete, W., Boon, N., 2014. Inoculum selection is crucial to ensure

- operational stability in anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 189–199. doi:10.1007/s00253-014-6046-3
- Dębowski, M., Zieliński, M., Grala, A., Dudek, M., 2013. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies - Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 596–604. doi:10.1016/j.rser.2013.07.029
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173–190. doi:10.1007/s11157-008-9131-1
- Di Bella, J.M., Bao, Y., Gloor, G.B., Burton, J.P., Reid, G., 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J. Microbiol. Methods* 95, 401–414. doi:10.1016/j.mimet.2013.08.011
- Díaz-Báez, M.C., Vargas, S.L.E., Pérez, F.M., 2002. Digestión anaerobia: una aproximación a la tecnología. Universidad Nacional de Colombia. doi:958-70-1-196-1
- Dong, T., Knoshaug, E.P., Davis, R., Laurens, L.M.L., Van Wyken, S., Pienkos, P.T., Nagle, N., 2016. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. *Algal Res.* 19, 316–323. doi:10.1016/j.algal.2015.12.021
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering hundreds of times faster than BLAST. *Bioinformatics* 12, 1–3. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Ek, A.E.W., Hallin, S., Vallin, L., Schnürer, A., Karlsson, M., 2011. Slaughterhouse waste co-digestion - Experiences from 15 years of full-scale operation. *World Renew. Energy Congr. 2011 - Sweden* 64–71.

- Ellis, J.T., Tramp, C., Sims, R.C., Miller, C.D., Ellis, J.T., Tramp, C., Sims, R.C., Miller, C.D., 2012. Characterization of a methanogenic community within an algal fed anaerobic digester. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–12. doi:10.5402/2012/753892
- Ferrer, J., Seco, A., 2007. *Tratamientos biológicos de aguas residuales*, 2nd ed. ISBN: 978-84-8363-156-0
- Foresti, E., Zaiat, M., Vallero, M., 2006. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 3–19. doi:10.1007/s11157-005-4630-9
- Fotidis, I.A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T.A., Martzopoulos, G.G., Angelidaki, I., 2013. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 38–48. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01456.x
- Frigon, J.C., Matteau-Lebrun, F., Hamani Abdou, R., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy* 108, 100–107. doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.051
- Frock, A.D., Kelly, R.M., 2012. Extreme thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 1, 363–372. doi:10.1016/j.coche.2012.07.003
- Fulke, A.B., Chambhare, K.Y., Sangolkar, L.N., Giripunje, M.D., Krishnamurthi, K., Juwarkar, A.A., Chakrabarti, T., 2013. Potential of wastewater grown algae for biodiesel production and CO₂ sequestration. *African J. Biotechnol.* 12, 2939–2948. doi:10.5897/AJB13.12169
- Gallert, C., Winter, J., 2005. *Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems*, Environmental Biotechnology. doi:10.1002/3527604286.ch1

- Garcia, M.L., Angenent, L.T., 2009. Interaction between temperature and ammonia in mesophilic digesters for animal waste treatment. *Water Res.* 43, 2373–2382. doi:10.1016/j.watres.2009.02.036
- Geng, A., He, Y., Qian, C., Yan, X., Zhou, Z., 2010. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. *Bioresour. Technol.* 101, 4029–4033. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.042
- Germane, K.L., Servinsky, M.D., Gerlach, E.S., Sund, C.J., Hurley, M.M., 2015. Structural analysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 glycoside hydrolase from CAZy family GH105. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 71, 1100–1108. doi:10.1107/S2053230X15012121
- Giménez, J.B., Martí, N., Ferrer, J., Seco, A., 2012. Methane recovery efficiency in a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAnMBR) treating sulphate-rich urban wastewater: Evaluation of methane losses with the effluent. *Bioresour. Technol.* 118, 67–72. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.019
- Giménez, J.B., Robles, a., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M. V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., Seco, A., 2011. Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresour. Technol.* 102, 8799–8806. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.014
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic digestion of algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47–55.
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–223. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.123

- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012a. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresour. Technol.* 110, 610–616. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.043
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012b. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy* 40, 105–111. doi:10.1016/j.biombioe.2012.02.008
- González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B., 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: challenges, opportunities and research needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.095
- Grethlein, H.E., 1978. Anaerobic digestion and membrane separation of domestic water. *Water Pollut. Control Fed.* 50, 745–763. doi:http://www.jstor.org/stable/25039620
- Grobbelaar, J.U., 2007. Algal Nutrition – Mineral Nutrition, in: *Handbook of Microalgal Culture*. pp. 95–115. doi:10.1002/9780470995280.ch6
- Gruber-Brunhumer, M.R., Jerney, J., Zohar, E., Nussbaumer, M., Hieger, C., Bromberger, P., Bochmann, G., Jirsa, F., Schagerl, M., Obbard, J.P., Fuchs, W., Drosch, B., 2016. Associated effects of storage and mechanical pre-treatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 93, 259–268. doi:10.1016/j.biombioe.2016.07.013
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 15, 127–167.
- Gupta, S.K., Ansari, F.A., Shriwastav, A., Sahoo, N.K., Rawat, I., Bux, F., 2016. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for biofuels. *J. Clean. Prod.* 115, 255–264. doi:10.1016/j.jclepro.2015.12.040

- Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., Lu, X., 2016. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 0–1. doi:10.1016/j.rser.2016.11.184
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Hatamoto, M., Kaneshige, M., Nakamura, A., Yamaguchi, T., 2014. *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1770–1774. doi:10.1099/ij.s.0.056630-0
- Hattori, S., 2008. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microbes Environ.* 23, 118–127. doi:10.1264/jsme2.23.118
- Heaven, S., Milledge, J., Zhang, Y., 2011. Comments on “Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable.” *Biotechnol. Adv.* 29, 164–167. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.10.005
- Hidaka, T., Inoue, K., Suzuki, Y., Tsumori, J., 2014. Growth and anaerobic digestion characteristics of microalgae cultivated using various types of sewage. *Bioresour. Technol.* 170, 83–89. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.061
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.C., De Laclos, H.F., Ghasimi, D.S.M., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Pfund, F.R., Strömberg, S., Torrijos, M., Van Eekert, M., Van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci. Technol.* 74, 2515–2522. doi:10.2166/wst.2016.336

- Hulshoff Pol, L.W., De Castro Lopes, S.I., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2004. Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 38, 1376–1389. doi:10.1016/j.watres.2003.12.002
- Hussain, A., Dubey, S.K., 2015. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Desalin. Water Treat.* 52, 7015–7025. doi:10.1080/19443994.2013.823116
- Inglesby, A.E., Fisher, A.C., 2012. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy Environ. Sci.* 5, 7996. doi:10.1039/c2ee21659k
- Inglesby, A.E., Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., van Hille, R.P., 2015. Anaerobic digestion of *Spirulina* sp. and *Scenedesmus* sp.: a comparison and investigation of the impact of mechanical pre-treatment. *J. Appl. Phycol.* 27, 1891–1900. doi:10.1007/s10811-015-0669-3
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Dröge, M., Gartemann, K.H., Jünemann, S., Kaiser, O., Krause, L., Tille, F., Zakrzewski, M., Pühler, A., Schlüter, A., Goesmann, A., 2011. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One* 6, e14519. doi:10.1371/journal.pone.0014519
- Jawed, M., Tare, V., 2000. Post-mortem examination and analysis of anaerobic filters. *Bioresour. Technol.* 72, 75–84. doi:10.1016/S0960-8524(99)00087-5
- Jeison, D., van Lier, J.B., 2007. Cake formation and consolidation: Main factors governing the applicable flux in anaerobic submerged membrane bioreactors (AnSMBR) treating acidified wastewaters. *Sep. Purif. Technol.* 56, 71–78. doi:10.1016/j.seppur.2007.01.022
- Ju, F., Zhang, T., 2014. Novel microbial populations in ambient and mesophilic biogas-producing and phenol-degrading consortia unraveled by high-

- throughput sequencing. *Microb. Ecol.* 68, 235–246. doi:10.1007/s00248-014-0405-6
- Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W., Schnell, S., 2012. Unexpected stability of Bacteroidetes and Firmicutes communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2106–2119. doi:10.1128/AEM.06394-11
- Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res.* 43, 4093–4103. doi:10.1016/j.watres.2009.03.001
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Angelidaki, I., 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 331–338. doi:10.1128/AEM.71.1.331
- Kaseng, K., Ibrahim, K., Paneerselvam, S.V., Hassan, R.S., 1992. Extracellular enzymes and acidogen profiles of laboratory-scale two-phase anaerobic digestion system. *Process Biochem.* 27, 43–47. doi:10.1016/0032-9592(92)80008-q
- Keymer, P., Ruffell, I., Pratt, S., Lant, P., 2013. High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. *Bioresour. Technol.* 131, 128–133. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.125
- Khan, A.A., Gaur, R.Z., Tyagi, V.K., Khursheed, A., Lew, B., Mehrotra, I., Kazmi, A.A., 2011. Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 55, 1232–1251. doi:10.1016/j.resconrec.2011.05.017
- Khanal, S.K., Giri, B., Nitayavardhana, S., Gadhamshetty, V., 2017. Anaerobic Bioreactors/Digesters: Design and developments, *Current Developments in*

- Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-63665-2.00010-2
- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J., 2014. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. *Water Res.* 57, 247–257. doi:10.1016/j.watres.2014.03.043
- Kiran, E.U., Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2016. Production of biogas via anaerobic digestion. *Handbook of Biofuels Production*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-08-100455-5.00010-2
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Wobbe, L., Schlüter, A., Kruse, O., Mussnug, J.H., 2016. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. *J. Biotechnol.* 234, 7–26. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.07.015
- Komolafe, O., Velasquez Orta, S.B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I.Y., Harvey, A.P., Orta Ledesma, M.T., 2014. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresour. Technol.* 154, 297–304. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.048
- Kraker-Castañeda, C., Cobar-Carranza, A.J., 2011. Uso de rarefacción para comparación de la riqueza de especies: el caso de las aves de sotobosque en la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachua, Guatemala. *Nat. y Desarro.* 9, 60–70. doi:1576 - 9518
- Krumböck, M., Conrad, R., 1991. Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 8, 247–256. doi:10.1111/j.1574-
- Kwietniewska, E., Tys, J., 2014. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on

- microalgal biomass fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34, 491–500. doi:10.1016/j.rser.2014.03.041
- Law, Y., Ye, L., Pan, Y., Yuan, Z., 2012. Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1265–1277. doi:10.1098/rstb.2011.0317
- Lee, J.W., Day, D.M., 2013. Smokeless biomass pyrolysis for producing biofuels and biochar as a possible arsenal to control climate change, in: Lee, J.W. (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts*. p. 1101. doi:10.1007/978-1-4614-3348-4
- Lester, J.N., Soares, A., San Martin, D., Harper, P., Jefferson, B., Brigg, J., Wood, E., Cartmell, E., 2009. A novel approach to the anaerobic treatment of municipal wastewater in temperate climates through primary sludge fortification. *Environ. Technol.* 30, 985–94. doi:10.1080/09593330903029424
- Lettinga, G., Velsen, A.F.M. van, Hobma, S.W., Zeeuw, W.J. de, Klapwijk, A., 1980. Use of Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699–734.
- Lew, B., Tarre, S., Beliaevski, M., Dosoretz, C., Green, M., 2009. Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination* 243, 251–257. doi:10.1016/j.desal.2008.04.027
- Li, W.W., Yu, H.Q., 2011. From wastewater to bioenergy and biochemicals via two-stage bioconversion processes: A future paradigm. *Biotechnol. Adv.* 29, 972–982. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.012
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel

- p>production. Bioresour. Technol. 102, 5138–5144.
-
- doi:10.1016/j.biortech.2011.01.091
- Li, Y.F., Nelson, M.C., Chen, P.H., Graf, J., Li, Y., Yu, Z., 2014. Comparison of the microbial communities in solid-state anaerobic digestion (SS-AD) reactors operated at mesophilic and thermophilic temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 969–980. doi:10.1007/s00253-014-6036-5
- Lin, H., Peng, W., Zhang, M., Chen, J., Hong, H., Zhang, Y., 2013. A review on anaerobic membrane bioreactors: Applications, membrane fouling and future perspectives. Desalination 314, 169–188. doi:10.1016/j.desal.2013.01.019
- Liu, T., Sung, S., 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. Water Sci. Technol. 45, 113–110.
- Liu, X., Ying, K., Chen, G., Zhou, C., Zhang, W., Zhang, X., Cai, Z., Holmes, T., Tao, Y., 2017. Growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.160
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac : a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8228–8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228
- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R., 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. ISME J. 5, 169–172. doi:10.1038/ismej.2010.133
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., He, P., 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. Biotechnol. Biofuels 6, 92. doi:10.1186/1754-6834-6-92

- Lyu, H., Gong, Y., Gurav, R., Tang, J., 2016. Potential Application of Biochar for Bioremediation of Contaminated Systems, Biochar Application: Essential Soil Microbial Ecology. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803433-0.00009-6
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V, Clark, D.P., 2009. Brock Biology of microorganisms, 12th edn.ISBN: 978-84-7829-097-0
- Mahdy, A., Fotidis, I.A., Mancini, E., Ballesteros, M., González-Fernández, C., Angelidaki, I., 2017. Ammonia tolerant inocula provide a good base for anaerobic digestion of microalgae in third generation biogas process. Bioresour. Technol. 225, 272–278. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.086
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014a. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. Energy Convers. Manag. 85, 551–557. doi:10.1016/j.enconman.2014.04.097
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014b. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. Energy 78, 1–5. doi:10.1016/j.energy.2014.05.052
- Manninen, K., Huttunen, S., Seppälä, J., Laitinen, J., Spilling, K., 2016. Resource recycling with algal cultivation: Environmental and social perspectives. J. Clean. Prod. 134, 495–505. doi:10.1016/j.jclepro.2015.10.097
- Mañas, A., Pocquet, M., Biscans, B., Sperandio, M., 2012. Parameters influencing calcium phosphate precipitation in granular sludge sequencing batch reactor. Chem. Eng. Sci. 77, 165–175. doi:10.1016/j.ces.2012.01.009
- Mara, D., Horan, N., 2003. Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Handbook of Water and Wastewater Microbiology. doi:10.1016/B978-012470100-7/50029-7

- Markou, G., 2015. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. *Bioresour. Technol.* 193, 35–41. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.071
- Martí, N., 2007. Estudio de las estrategias de operación de la digestión anaerobia de fangos para optimizar la recuperación de fósforo en EDAR. Universitat de València.
- Martí, N., Pastor, L., Bouzas, A., Ferrer, J., Seco, A., 2010. Phosphorus recovery by struvite crystallization in WWTPs: Influence of the sludge treatment line operation. *Water Res.* 44, 2371–2379. doi:10.1016/j.watres.2009.12.043
- Mata-Alvarez, J., 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. *IWA J.* 111–140. doi:DOI: 10.2166/9781780402994
- Mbarki, S., Cerdà, A., Brestic, M., Mahendra, R., Abdelly, C., Pascual, J.A., 2016. Vineyard compost supplemented with *Trichoderma Harzianum* T78 improve saline soil quality. *L. Degrad. Dev.* 1099. doi:10.1002/ldr.2554
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P., 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610–618. doi:10.1038/ismej.2011.139
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.* 83, 37–46. doi:10.1016/S0960-8524(01)00118-3
- Mendez, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015. Biomethane production using fresh and thermally pretreated *Chlorella vulgaris* biomass: A comparison of batch and semi-continuous feeding mode. *Ecol. Eng.* 84, 273–277. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.09.056

- Mendez, L., Mahdy, A., Demuez, M., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. *Fuel* 117, 674–679. doi:10.1016/j.fuel.2013.09.032
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* 149, 136–141. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.136
- Metcalf&Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, H., Tsuchihashi, R., Burton, F., 2013. *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*, 5th ed. ISBN: 978-0073401188
- Mo, W., Zhang, Q., 2013. Energy-nutrients-water nexus: Integrated resource recovery in municipal wastewater treatment plants. *J. Environ. Manage.* 127, 255–267. doi:10.1016/j.jenvman.2013.05.007
- Molina, J., Jácome, A., Justo, E., Suárez, J., Cagiao, J., Rodríguez, J., González, C., 2003. Evaluación de la tratabilidad biológica de las aguas residuales urbanas de Coruña y municipios limítrofes.
- Molinuevo-Salces, B., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. *Renew. Energy* 96, 1103–1110. doi:10.1016/j.renene.2016.01.090
- Montingelli, M.E., Tedesco, S., Olabi, A.G., 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43, 961–972. doi:10.1016/j.rser.2014.11.052
- Moñino, P., Aguado, D., Barat, R., Jiménez, E., Giménez, J.B., Seco, A., Ferrer, J., 2017. A new strategy to maximize organic matter valorization in

- municipalities: Combination of urban wastewater with kitchen food waste and its treatment with AnMBR technology. Waste Manag. doi:10.1016/j.wasman.2017.02.006
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. J. Biotechnol. 150, 51–56. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.030
- Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z., 2011. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. Bioresour. Technol. 102, 3730–3739. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.119
- Němcová, Y., 2003. Detection of cell wall structural polysaccharides by cellulase-gold and chitinase-gold complexes. Czeeg Phycol. 3, 31–36.
- Nolla-Ardèvol, V., Peces, M., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2015. Metagenome from a *Spirulina* digesting biogas reactor: analysis via binning of contigs and classification of short reads. BMC Microbiol. 15, 277. doi:10.1186/s12866-015-0615-1
- O’Flaherty, V., Mahony, T., O’Kennedy, R., Colleran, E., 1998. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. Process Biochem. 33, 555–569. doi:10.1016/S0032-9592(98)00018-1
- Oehlert, G.W., 2003. A First Course in Design and Analysis of Experiments, The American Statistician. doi:10.1198/tas.2003.s210
- Olsson, J., Feng, X.M., Ascue, J., Gentili, F.G., Shabiimam, M.A., Nehrenheim, E., Thorin, E., 2014. Co-digestion of cultivated microalgae and sewage sludge from municipal waste water treatment. Bioresour. Technol. 171, 203–210. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.069

- Ometto, F., Quiroga, G., Psenicka, P., Whitton, R., Jefferson, B., Villa, R., 2014. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasounds and enzymatic hydrolysis. *Water Res.* 64, 350–361. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.040>
- Oosterkamp, M.J., Mendez-Garcia, C., Kim, C.-H., Bauer, S., Ibanez, A.B., Zimmerman, S., Hong, P.-Y., Cann, I.K., Mackie, R.I., 2016. Lignocellulose-derived thin stillage composition and efficient biological treatment with a high-rate hybrid anaerobic bioreactor system. *Biotechnol. Biofuels* 9, 120. doi:[10.1186/s13068-016-0532-z](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0532-z)
- Oswald, W.J., Asce, A.M., Gotaas, H.B., 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Am. Soc. Civ. Eng. Paper* N° 2.
- Pachés, M., Romero, I., Hermosilla, Z., Martínez-Guijarro, R., 2012. PHYMED: An ecological classification system for the Water Framework Directive based on phytoplankton community composition. *Ecological Indicators* 19, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.07.003>
- Passos, F., Ferrer, I., 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res.* 68, 364–373. doi:[10.1016/j.watres.2014.10.015](https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.015)
- Passos, F., García, J., Ferrer, I., 2013a. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 138, 79–86. doi:[10.1016/j.biortech.2013.03.114](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.114)
- Passos, F., Hernández-Mariné, M., García, J., Ferrer, I., 2014a. Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Res.* 49. doi:[10.1016/j.watres.2013.10.013](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.013)

- Passos, F., Hom-Díaz, A., Blázquez, P., Vicent, T., Ferrer, I., 2016. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresour. Technol.* 199, 347–351. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.084
- Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I., 2013b. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl. Energy* 108, 168–175. doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.042
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014b. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.114
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gómez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Rev. Environ. Control* 21, 411–490. doi:http://dx.doi.org/10.1080/10643389109388424
- Perazzoli, S., Bruchez, B.M., Michelon, W., Steinmetz, R.L.R., Mezzari, M.P., Nunes, E.O., da Silva, M.L.B., 2016. Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of *Scenedesmus* spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 109, 23–28. doi:10.1016/j.ibiod.2015.12.027
- Petrova, O.E., Tarasova, N.B., Davydova, M.N., 2002. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. *Anaerobe* 8, 315–317. doi:10.1016/S1075-9964(03)00029-5
- Pintilie, L., Torres, C.M., Teodosiu, C., Castells, F., 2016. Urban wastewater reclamation for industrial reuse: An LCA case study. *J. Clean. Prod.* 139, 1–14. doi:10.1016/j.jclepro.2016.07.209
- Powar, M.M., Kore, V.S., Kore, S. V, Kulkarni, G.S., 2013. Review on applications of UASB technology for wastewater treatment. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Technol.* 2, 125–133.

- Pretel, R., Moñino, P., Robles, A., Ruano, M. V., Seco, A., Ferrer, J., 2016a. Economic and environmental sustainability of an AnMBR treating urban wastewater and organic fraction of municipal solid waste. *J. Environ. Manage.* 179, 83–92. doi:10.1016/j.jenvman.2016.04.057
- Pretel, R., Robles, A., Ruano, M. V., Seco, A., Ferrer, J., 2016b. Economic and environmental sustainability of submerged anaerobic MBR-based (AnMBR-based) technology as compared to aerobic-based technologies for moderate-/high-loaded urban wastewater treatment. *J. Environ. Manage.* 166, 45–54. doi:10.1016/j.jenvman.2015.10.004
- Privé, F., Kaderbhai, N.N., Girdwood, S., Worgan, H.J., Pinloche, E., Scollan, N.D., Huws, S.A., Newbold, C.J., 2013. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0069076
- Qureshi, N., Liu, S., Ezeji, T.C., 2013. Cellulosic Butanol Production from Agricultural Biomass and Residues: Recent Advances in Technology, in: Lee, J. (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts*. p. 1101. doi:10.1007/978-1-4614-3348-4
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 200–206. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.146
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy* 103, 444–467. doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.004
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88, 3411–3424. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.025

- Rincón, B., Feroso, F.G., Borja, R., 2012. Olive oil mill waste treatment : Improving the sustainability of the olive oil industry with anaerobic digestion technology, in: Boskou, D.D. (Ed.), Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. p. 510.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A., 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. ISME J. 3, 700–714. doi:10.1038/ismej.2009.2
- Ronda, S.R., Kethineni, C., Parupudi, L.C.P., Thunuguntla, V.B.S.C., Vemula, S., Settaluri, V.S., Allu, P.R., Grande, S.K., Sharma, S., Kandala, C.V., 2014. A growth inhibitory model with SO_x influenced effective growth rate for estimation of algal biomass concentration under flue gas atmosphere. Bioresour. Technol. 152, 283–291. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.091
- Ruiz-Martinez, A., Martin Garcia, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. Bioresour. Technol. 126, 247–253. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.022
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 35, 265–278. doi:10.1016/j.rser.2014.04.007
- Sánchez-Ramírez, J.E., Seco, A., Ferrer, J., Bouzas, A., García-Usach, F., 2015. Treatment of a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAnMBR) effluent by an activated sludge system: The role of sulphide and thiosulphate in the process. J. Environ. Manage. 147, 213–218. doi:10.1016/j.jenvman.2014.04.043

- Sanz, J.L., Rojas, P., Morato, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pre-treated microalgae biomasses. *Chemosphere* 168, 1013–1021. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.109
- Sasaki, K., Morita, M., Sasaki, D., Nagaoka, J., Matsumoto, N., Ohmura, N., Shinozaki, H., 2011. Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 469–472. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.07.003
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.* 1, 20–43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Schnürer, A., Houwen, F.P., Svensson, B.H., 1994. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Arch. Microbiol.* 162, 70–74. doi:10.1007/s002030050103

- Schnürer, A., Nordberg, A., 2008. Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci. Technol.* 57, 735–740. doi:10.2166/wst.2008.097
- Seghezzo, L., 2004. Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions, *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*. ISBN: 9085040299
- Seo, C., Kim, W., Chang, H.N., Han, J.-I., Kim, Y.-C., 2016. Comprehensive study on volatile fatty acid production from *Ettlia* sp. residue with molecular analysis of the microbial community. *Algal Res.* 17, 161–167. doi:10.1016/j.algal.2016.04.015
- Shin, S.G., Zhou, B.W., Lee, S., Kim, W., Hwang, S., 2011. Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochem.* 46, 1035–1038. doi:10.1016/j.procbio.2011.01.009
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgae biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27, 409–416. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.001
- Siles, J.A., Brekelmans, J., Martín, M.A., Chica, A.F., Martín, A., 2010. Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 101, 9040–9048. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.163
- Skouteris, G., Hermosilla, D., López, P., Negro, C., Blanco, Á., 2012. Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: A review. *Chem. Eng. J.* 198–199, 138–148. doi:10.1016/j.cej.2012.05.070
- Solli, L., Håvelsrud, O.E., Horn, S.J., Rike, A.G., 2014. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol. Biofuels* 7, 146. doi:10.1186/s13068-014-0146-2

- Song, Y.C., Kwon, S.J., Woo, J.H., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 38, 1653–1662. doi:10.1016/j.watres.2003.12.019
- Speece, R.E., 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater*. ISBN: 0965022609
- St-Pierre, B., Wright, A.D.G., 2014. Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2709–2717. doi:10.1007/s00253-013-5220-3
- Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sørensen, S.J., Karlsson, A., 2013. 454 Pyrosequencing analyses of Bacterial and Archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 612–626. doi:10.1111/1574-6941.12148
- Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53, 43–52. doi:10.1016/S0045-6535(03)00434-X
- Sung, S., Santha, H., 2001. Performance of temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system treating dairy cattle wastes. *Tamkang J. Sci. Eng.* 4, 301–310. doi:10.1016/S0043-1354(02)00498-0
- Tabatabaei, M., Rahim, R.A., Abdullah, N., Wright, A.D.G., Shirai, Y., Sakai, K., Sulaiman, A., Hassan, M.A., 2010. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process Biochem.* 45, 1214–1225. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.017
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M., 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 9, e105592. doi:10.1371/journal.pone.0105592

- Tartakovsky, B., Matteau-Lebrun, F., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Methane production from the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD in a continuous anaerobic reactor. *Algal Res.* 2, 394–400. doi:10.1016/j.algal.2013.07.002
- Tijani, H., Abdullah, N., Yuzir, A., 2015. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 1610–1622. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.179
- Toledo-Cervantes, A., Serejo, M.L., Blanco, S., Pérez, R., Lebrero, R., Muñoz, R., 2016. Photosynthetic biogas upgrading to bio-methane: Boosting nutrient recovery via biomass productivity control. *Algal Res.* 17, 46–52. doi:10.1016/j.algal.2016.04.017
- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Res.* 5, 95–102. doi:10.1016/j.algal.2014.06.001
- Uggetti, E., Sialve, B., Latrille, E., Steyer, J.P., 2014. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour. Technol.* 152, 437–443. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.036
- Ullah, K., Ahmad, M., Sofia, Sharma, V.K., Lu, P., Harvey, A., Zafar, M., Sultana, S., 2015. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: A review. *Fuel* 143, 414–423. doi:10.1016/j.fuel.2014.10.064
- UNEP, 2012. GEO 5 - Global Environmental Outlook: Environment for the future we want, United Nations Environmental Program. doi:10.2307/2807995
- Unkefer, C.J., Sayre, R.T., Magnuson, J.K., Anderson, D.B., Baxter, I., Blaby, I.K., Brown, J.K., Carleton, M., Cattolico, R.A., Dale, T., Devarenne, T.P., Downes, C.M., Dutcher, S.K., Fox, D.T., Goodenough, U., Jaworski, J., Holladay, J.E.,

- Kramer, D.M., Koppisch, A.T., Lipton, M.S., Marrone, B.L., McCormick, M., Molnár, I., Mott, J.B., Ogden, K.L., Panisko, E.A., Pellegrini, M., Polle, J., Richardson, J.W., Sabarsky, M., Starkenburg, S.R., Stormo, G.D., Teshima, M., Twary, S.N., Unkefer, P.J., Yuan, J.S., Olivares, J.A., 2016. Review of the algal biology program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. *Algal Res.* 22, 187–215. doi:10.1016/j.algal.2016.06.002
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., Tyson, G.W., 2015. Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Sci. Rep.* 5, 8496. doi:10.1038/srep08496
- Vassilev, S. V., Vassileva, C.G., 2016. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. *Fuel* 181, 1–33. doi:10.1016/j.fuel.2016.04.106
- Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á., Ruano, M.V., Ferrer, J., Seco, A., 2016. Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from an anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage. *Bioresour. Technol.* 218, 447–454. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.116
- Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P., Burczyk, J., 2014. The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 215-216, 39–47. doi:10.1016/j.plantsci.2013.10.011
- Wang, M., Park, C., 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass and Bioenergy* 80, 30–37. doi:10.1016/j.biombioe.2015.04.028

- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C., 2013. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 142, 585–590. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.096
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* 5, 204–214. doi:10.1016/j.algal.2014.02.001
- Weiland, P., 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–860. doi:10.1007/s00253-009-2246-7
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5, 41. doi:10.1186/1754-6834-5-41
- Wirth, R., Lakatos, G., Böjti, T., Maróti, G., Bagi, Z., Kis, M., Kovács, A., Ács, N., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2015. Metagenome changes in the mesophilic biogas-producing community during fermentation of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Biotechnol.* 215, 52–61. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.396
- Xin, C., Addy, M.M., Zhao, J., Cheng, Y., Cheng, S., Mu, D., Liu, Y., Ding, R., Chen, P., Ruan, R., 2016. Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study. *Bioresour. Technol.* 211, 584–593. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.102
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., 2009. Cultivation of uncultured Chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi “subphylum i” with natural and biotechnological relevance. *Microbes Environ.* 24, 205–216. doi:10.1264/jsme2.ME09151S
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic

- methanogenic sludge granules. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7493–7503. doi:10.1128/AEM.71.11.7493-7503.2005
- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T.K., Tang, D.T.W., Fung, W.C., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5709–5718. doi:10.1007/s00253-014-5648-0
- Yen, H.W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. Bioresour. Technol. 98, 130–134. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.010
- Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. Process Biochem. 48, 901–911. doi:10.1016/j.procbio.2013.04.012
- Young, J.C., 1991. Factors affecting the design and Performance of upflow anaerobic filters. Water Sci. Technol. 24, 133–155.
- Yu, H., Wang, Z., Wu, Z., Zhu, C., 2016. Enhanced waste activated sludge digestion using a submerged anaerobic dynamic membrane bioreactor: performance, sludge characteristics and microbial community. Sci. Rep. 6, 20111. doi:10.1038/srep20111
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2012a. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. Appl. Energy 92, 733–738. doi:10.1016/j.apenergy.2011.08.017
- Zamalloa, C., De Vrieze, J., Boon, N., Verstraete, W., 2012b. Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 859–869. doi:10.1007/s00253-011-3624-5

- Zamanzadeh, M., Hagen, L.H., Svensson, K., Linjordet, R., Horn, S.J., 2016. Anaerobic digestion of food waste - Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Res.* 96, 246–254. doi:10.1016/j.watres.2016.03.058
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. doi:10.1093/bioinformatics/btt593
- Zhang, L., Lee, Y.W., Jahng, D., 2012. Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggy wastewater. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 36–42. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.049
- Zhao, H.W., Viraraghavan, T., 2004. Analysis of the performance of an anaerobic digestion system at the Regina wastewater treatment plant. *Bioresour. Technol.* 95, 301–307. doi:10.1016/j.biortech.2004.02.023
- Zheng, D., Raskin, L., 2000. Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microb. Ecol.* 39, 246–262. doi:10.1007/s002480000003
- Zheng, M.X., Wang, K.J., Zuo, J.E., Yan, Z., Fang, H., Yu, J.W., 2012. Flow pattern analysis of a full-scale expanded granular sludge bed-type reactor under different organic loading rates. *Bioresour. Technol.* 107, 33–40. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.102
- Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R., 2016. Optimization of enzyme-assisted lipid extraction from *Nannochloropsis* microalgae. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 67, 106–114. doi:10.1016/j.jtice.2016.08.016

